1907

Aus dem physiologischen Institut zu Giessen.

EIN BEITRAG ZUR KENNTNIS DES PANKREASSTEAPSINS.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der

veterinär-medizinischen Doktorwürde

der

vereinigten medizinischen Fakultät

der

Grossherzoglich Hessischen Ludwigs-Universität zu Giessen

vorgelegt von

WILHELM STOLZ

approb. Tierarzt aus Ehrenbreitstein.

GIESSEN 1907

von Münchow'sche Hof- und Universitäts-Druckerei (O. Kindt).

Aus dem physiologischen Institut zu Giessen.

EIN BEITRAG ZUR KENNTNIS DES PANKREASSTEAPSINS.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der

veterinär-medizinischen Doktorwürde

der

vereinigten medizinischen Fakultät

der

Grossherzoglich Hessischen Ludwigs-Universität zu Giessen

vorgelegt von

WILHELM STOLZ

approb. Tierarzt aus Ehrenbreitstein.

Giessen 1907

von Münchow'sche Hof- und Universitäts-Druckerei (O. Kindt).

Gedruckt mit Genehmigung der vereinigten medizinischen Fakultät.
13. XI. 06.
Referent: Professor Dr. Frank.

Einleitung.

Für die Verdauung und Resorption der Fette im Tierkörper ist, wie jetzt vorzugsweise angenommen wird, ihre vorherige Spaltung in Glycerin und Fettsäuren bezw. ihre Verseifung erforderlich. Das wichtigste Agens, das die Spaltung der Fette im Darmlumen bewirkt, ist das fettspaltende Ferment des Bauchspeichels.

Die fettspaltende Wirkung des Sekrets der Bauchspeicheldrüse wurde entdeckt von Claude Bernard und ist seitdem vielfach bestätigt worden, wenngleich manche Forscher auch neuerdings noch daran zweifelten.

Schwieriger ist die Wirkung festzustellen an Extrakten der Drüsensubstanz; aber durch die Untersuchungen Grützners und Kühnes (Verzeichnis No. 9, 14) ist doch auch in der Drüsensubstanz und in daraus hergestellten Extrakten die fettspaltende Wirkung sicher nachgewiesen. Allerdings ist das Steapsin nach allen Forschern sehr empfindlich, und darauf beruhen die gänzlich negativen Resultate mancher Autoren.

Ueber die Abhängigkeit der Wirkung des Pankreassteapsins von der Menge des Fermentes selbst und von der Zeit, während welcher das Ferment wirkt, existiert bisher nur eine Untersuchung von Engel, ausgeführt unter der Leitung von Volhard (Verzeichnis No. 8), aus der er folgert, dass auch für das Pankreassteapsin die sog. Schütz-Borissow'sche Regel als gültig anzusehen ist, d. h. dass die Wirkung der Quadratwurzel sowohl der wirkenden Fermentmenge als der Wirkungszeit proportional geht.

Um über diese Verhältnisse Aufschluss zu bekommen, veranlasste mich Herr Otto Frank, die Frage nochmals zu untersuchen und vor allem eine sichere Methodik vorzubereiten.

Für die systematische Untersuchung der Hauptfrage sind eine grosse Menge von Einzelversuchen notwendig, deren Ausführung äusserst langwierig wird, wenn man nach der alten Methode mit der Extraktion der Verdauungsgemische bezw. ihrer Trockenrückstände mit Äther verfährt.

Es würde die Untersuchung sehr vereinfacht haben, wenn man, wie auch schon von Engel versucht worden war, durch passenden Alkohol- und Aetherzusatz eine homogene Lösung des Verdauungsgemisches erzielen könnte, welches direkt titriert werden konnte.

Ich habe mit einer solchen einfachen Methode zunächst eine Reihe von Versuchen angestellt, die zum Ziele zu führen schienen; erst im Verlauf derselben wurde klar, dass wegen mehrerer gleich zu berührender Punkte eine gründliche Durcharbeitung der Methodik, als es in einigen auch vorher angestellten kurzen Orientierungsversuchen möglich war, unbedingtes Erfordernis für ein nutzbringendes Weiterarbeiten ist; aber nicht allein diese einfachere Titrierungsart musste kritisch durchgearbeitet werden, sondern es war auch notwendig, das zweckmässigste Substrat für die Spaltung, ferner musste die zweckmässigste Darstellung fermenthaltiger Extrakte ausfindig gemacht werden. Dazu bedurften einige kleinere Nebenfragen der Aufklärung. Ich habe mich daher später nur auf die Ausarbeitung der Methodik beschränkt; weiteren Untersuchungen muss es überlassen bleiben, die eingangs aufgeworfene theoretisch wichtige Haupt-Frage definitiv zu lösen.

Es wird aber doch zweckmässig sein, zunächst einige von den Versuchen, die zur Lösung dieser Frage nach der Gültigkeit des Schütz-Borissow'schen Regel vorgenommen worden sind, ausführlich anzuführen, um an ihrem Ausfall darzutun, auf welche Dinge bei der Anstellung der Versuchsreihen zu achten ist. Ich bemerke ausdrücklich, dass ein bindender Schluss aus diesen Versuchen nicht gezogen wird; es scheint aus ihnen allerdings hervorzugehen, dass wenigstens die Abhängigkeit der Wirkung von der Fermentmenge in einer Kurve dargestellt werden muss, welche in den untersuchten Intervallen linear und nicht parabolisch (wie die von Schütz aufgestellte Beziehung verlangt hätte) verläuft; ich werde daher auch, wo im Verlauf der Arbeit zwecks Vergleichung eine Umrechnung auf eine andere Fermentmenge notwendig ist — ganz lässt sich wegen störender Versuchszufälligkeiten davon nicht absehen — diese einfache Proportionalität als bestehend annehmen. Das kann umso eher geschehen, als bei den wenigen Fälle, in denen diese Umrechnung nötig wird, im Falle einer Umrechnung entsprechend der Schütz-Borissow'schen Regel im Prinzip das gleiche Ergebnis geliefert wird.

I. Vorläufige Prüfung der Gültigkeit der Schütz-Borissow'schen Regel.

(Zeit und Mengenversuche.)

Für die Versuchsreihen wurden in eine Anzahl kleiner Erlenmeyer Kölbchen von ca. 80—100 ccm Inhalt je 10 ccm Lecithin-Oel-Emulsion gegeben. Die Herstellung dieser Emulsion geschah so: 3 g ccm Lecithin Merck wurden in einer Reibschale langsam, anfangs tropfenweise, mit 15 ccm Olivenöl verrieben; dann wurden, ebenfalls ganz allmählich, 300 ccm Wasser zugefügt und schliesslich die Emulsion noch etwa 10 Minuten lang im Kolben geschüttelt. Diese Stammemulsion wurde für den Versuch entweder auf das Doppelte oder in der Regel auf das Dreifache mit Wasser verdünnt. Für die Herstellung der Emulsion kommt es auf sehr langsamen Zusatz von Öl und Wasser, äusserst sorgfältiges Verreiben und öfteres Abkratzen der am Pistill haftenden Teile sehr an.

Zu dieser Emulsion wurden die fermenthaltigen Extrakte zugefügt. Bei Glycerinextrakten wurde ein Zusatz von Chloroform nicht gemacht, bei den Wasserextrakten wurden je 5 Tropfen Chloroform zugegeben und die Kölbchen verkorkt. Alsdann wurde die ganze Reihe in den Brutschrank gestellt.

Für die Titration wurden erst 25 ccm Äther und dann 30 ccm Alkohol hinzugefügt; dadurch erzielt man eine, in den meisten Fällen klare homogene Mischung; stark glycerinhaltige Gemische bleiben trübe; ausserdem sind natürlich die Eiweisskörper ausgefällt. Als Indikator diente Phenolphtalein, titriert wurde mit $\frac{n}{10}$ Natronlauge.

Zur Kontrolle wurde eine gemessene Menge Fermentlösung und 10 ccm Emulsion am Ende der Versuchszeit titriert, meistens auch am Anfang. Schliesslich wurden 25 ccm Äther + 30 ccm Alkohol allein titriert oder bisweilen, da der Wert nur zwischen 0,15 und 0,3 schwankte, ein in den Versuchen vorher

oder nachher ermittelter Wert dafür in Rechnung gestellt. Dieser Wert ist von jeder Zahl zunächst abzuziehen, ehe sie für die weitere Berechnung verwendet wird. Die Berechnung gestaltet sich für die einzelnen Versuche wie folgt: Versuchswert — Fermentwert (am Ende der Versuchszeit) — Emulsionswert (am Ende der Versuchszeit) = Acidität der abgespaltenen Säuren; eventl. ist auch noch der Glycerinwert in Abzug zu bringen. Diese korrigierten Werte für die Acidität der abgespaltenen Säuren gebe ich in der zweiten Zahlenkolumne bei den einzelnen Versuchen. Alle Werte sind in $^1/_{10}$ normal NaOH ausgedrückt.

Ia. Mengenversuch.

Pankreaspulver III aus Rindspankreas, das 24 Std. an der Luft gelegen hat. Hiervon Glycerinextrakt 30 : 600, 24 Std. im Brutschrank extrahiert.

Emulsion: Lecithinöl-Emulsion, aufs 3fache verdünnt.

Zeit: 24 Std.

	$\frac{n}{10}$ NaOH	
1. 10 ccm Emulsion + 1 ccm Ferment	1,2	0,2
2. + 2	2,15	0,45
3. + 4	3,65	0,65
4. + 6	5,45	1,05
5. + 9	7,8	1,4
6. + 12	10,05	1,55
7. + 16	12,85	1,65
8. + 20	15,55	1,65
9. + 25	18,65	1,35
10. 10 ccm Ferment sofort	6,7	
10a. nach 24 Std.	7,0	
11. 10 ccm Emulsion sofort	0,3	
11a. nach 24 Std.	0,35	
12. 25 ccm Äther + 30 ccm Alkohol	0,15	
10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment + 25 ccm Äther + 30 ccm Alkohol	6,25	

Ib. Glycerinversuch.

	$\frac{n}{10}$ NaOH	
13. 10 ccm Glycerin + 25 ccm Äther + 30 ccm Alkohol	0,5	
5. 10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment ohne Glycerin	7,8	1,4
5a. + 3 ccm „	7,6	1,1
5b. + 7 „	7,4	0,8
5c. + 16 „	7,25	0,3

I c. Zeitversuch.

			$\frac{n}{10}$ NaOH	
1.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	nach 1 Std.	6,75	0,5
2.		2	6,80	0,55
3.		4	6,95	0,7
4.		6	7,65	1,2
5.		9	7,6	1,2
6.		11	7,6	1,2
6a	10 ccm Emulsion	11	0,35	
6b	10 ccm Ferment	11	7,05	
7.		16	7,8	1,4
8.		24	7,7	1,3
9.		25	7,85	1,45
9a	10 ccm Emulsion	24	0,35	
9b	10 ccm Ferment	24	7,0	
10.		30	7,85	1,45
11.		33	8,0	1,5
12.		35	7,95	1,45
13.		41	7,5 ?	
14.		46	8,4	1,9
15.		49	8,55	2,05
15a	10 ccm Emulsion	49	0,45	
	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	sofort	6,25	

II a. Mengenversuch.

Frisches Glycerinextrakt aus Pankreas, das 24 Std. gelegen hat. Auf 1 g Pankreas 2 ccm Glycerin. Das Extrakt wurde mit Wasser aufs 4fache verdünnt.

Emulsion: Lecithinöl-Emulsion, verdünnt.

Zeit: 24 Std.

			$\frac{n}{10}$ NaOH	
1.	10 ccm Emulsion +	1 ccm Ferment	2,2	0,4
2.		2	2,2	—
3.		4	7,4	1,0
4.		6	10,9	3,0
5.		9	15,8	1,8
6.		12	20,6	2,1
7.		16	23,75	—
8.		20	31,1	0,5
9.		25	38,9	0,6
10.		36	54,1	—
11.	10 ccm Emulsion	sofort	0,3	
12.		nach 24 Std.	0,3	
13.	10 ccm Ferment	24 Std.	15,4	

II b. Glycerinversuch.

		24 Std.	$\frac{n}{10}$ NaOH.	
5.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	ohne Glycerin	15,8	1,8
14.		+ 9 Glycerin	15,7	1,3

15.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	+ 16 Glycerin	15,7	1,1
16.		+ 25 „	15,0	0,1
17.		+ 36 „	14,3	0
18.	10 ccm Glycerin		0,6—0,55	
19.	36 „ starke Trübung		1,3	
20.	25 ccm Äther + 30 ccm Alkohol		0,2	
20a	Dasselbe		0,2	

II c. Zeitversuch.

Frisches Glycerinextrakt aus Pankreas, das 24 Std. gelegen hat, aufs 4fache verdünnt.

Emulsion: Lecithinöl-Emulsion wie bei dem zugehörigen Mengenversuch.

			$\frac{n}{10}$ NaOH	
1.	10 ccm Emulsion	sofort	0,3	
2.		nach 24 Std.	0,3	
3.		24 Std.	0,3	
4.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	sofort	13,8	
5.	10 ccm Ferment	nach 24 Std.	15,4	
6.		49 Std.	16,5	
	Mithin:			
	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment + 25 ccm Äther			
	+ 30 ccm Alkohol	sofort	13,8	
		nach 24 Std.	14,0	
		49 Std.	15,0	
7.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	nach 1 Std.	13,9	0,1
8.		2	13,95	0,15
9.		4	14,0	0,2
10.		6	14,30	0,5
11.		9	14,45	0,55
12.		12	14,6	0,7
13.		16	14,7	0,8
14.		20	15,2	1,2
15.		25	16,1	2,1
16.		31	16,5	2,2
17.		36	17,2	2,7
18.		40	17,4	2,7
19.		44	17,5	2,7
20.		49	17,4	2,4

III. Mengenversuch.

136 g Pankreasbrei, der 24 Std. an der Luft gelegen, werden mit 180 ccm Wasser 4 Std. im Brutschrank extrahiert und filtriert.

0,5 g rohes Pankreas entspricht 0,7 ccm Filtrat.

Emulsion: Lecithinöl-Emulsion, verdünnt.

Zeit: 24 Std.

Jedes Kölbchen erhält 5 Tropfen Chloroform.

Die Titration geschah in der Weise, dass zunächst mit einer annähernd normalen Natronlauge, deren Titre zu 1,289 bestimmt war, ungefähr neutralisiert wurde; dann wurde mit $\frac{n}{10}$ Normallauge (+) bezw. Schwefelsäure (—) genauer austitriert.

1.	10 ccm Emuls. +	1.0,7 ccm Ferm.	0 st.	L. +	3,55	$\frac{n}{10}$ L. =	3,55	—
2.		2.0,7	1,5	—	1,6		17,7	4,6
3.		4.0,7	2,55	—	0,55		32,4	5,7
4.		6.0,7	3,5	—	0,45		44,6	4,6
5.		9.0,7	5,0	+	2,3		66,7	6,6
6.		12.0,7	7,5	—	2,45		94,2	13,9
7.		16.0,7	9,6	+	2,35		118,4	11,6
8.		20.0,7	12,0		0		154,6	21,3
9.		25.0,7	14,0	+	3,0		183,4	16,8
10.		29.0,7	15,05	+	10,5		204,5	14,1
11a	10 ccm Ferm.	sofort			50,4			
11b		nach 24 Std.	8,0	—	7,7			95,4
12a	10 ccm Emuls.	sofort			0,4			
12b		nach 24 Std.			0,4			

IV a. Mengenversuch.

Trockenpulver III aus Rindspankreas, das 24 Std. an der Luft gelegen hat. Hiervon Glycerinextrakt — 6 : 120 — 24 Std. im Brutschrank extrahiert, filtriert.

Emulsion: Lecithinöl-Emulsion, verdünnt.

Zeit: 24 Std.

			$\frac{n}{10}$ Lauge		
1.	10 ccm Emulsion +	1 ccm Ferment	1,5	0,7	0,3
2.		2	2,5	1,5	0,6
3.		4	4,25	2,8	1,2
4.		6	6,2	4,3	1,9
5.		9	8,3	5,8	2,1
6.		12	10,8	7,7	2,7
7.		16	12,9	8,9	2,3
8.		25	18,2	12,3	2,0
9.	10 ccm Emulsion	nach 24 Std.	0,6		
9a.		24 „	0,6		
9b.		sofort	0,75		
9c.		„	0,65		
10.	10 ccm Ferment gekocht, mit Wasser titriert	nach 24 Std.	2,3		

Anm.: Es wurde die Fermentlösung mit Wasserzusatz — ohne Alkohol + Äther — titriert; die Titration in alkoholisch-ätherischer Lösung liefert höhere Werte; in einem 3 Tage später angestellten Versuch (IV b) ergab dieselbe Fermentlösung:

8 ccm Fermentlösung mit Wasserzusatz 2,0 $\frac{n}{10}$ L.

8 ccm „ mit 25 Äther + 30 Alkohol 5,2 „

Legt man für die Berechnung den Wert 2,3 für 10 ccm Fermentlösung

zu Grunde, so ergeben sich die Werte der ersten Kolumne; legt man aber den aus dem angeführten Versuch (IVb sich ergebenden Wert von 5,2 für 8 ccm Fermentlösung zu Grunde, dann erhält man die Zahlen der zweiten Kolumne.

IVb. Zeitversuch.

Trockenpulver III aus Rindspankreas, das 24 Std. an der Luft gelegen hat; hiervon Glycerinextrakt (30 : 600 24 Std. im Brutschrank extrahiert.

Emulsion: Lecithinöl-Emulsion, verdünnt. Emulsion und Ferment werden vor dem Ansetzen des Versuches auf 37° vorgewärmt, ½ Std. lang.

		$\frac{n}{10}$ NaOH	
1. 10 ccm Emulsion + 8 ccm Ferment	nach ¼ Std.	6,0	0,25
1a.	sofort	5,75	
2.	½	6,15	0,35
3.	¾	6,15	0,35
4.	1	6,2	0,3
4a. + 8 ccm Ferment gekocht	1	5,9	
4b. + 10 ccm „ „	1	7,4	
5.	1½	6,4	0,5
6.	2	6,3	0,4
6a. + 8 ccm Ferment gekocht	2	5,9	
7.	2½	6,45	0,5
8.	3	6,3	0,4
8a. + 8 ccm Ferment gekocht	3	5,95	
9. 10 ccm Emulsion	sofort	0,4	
9a.	nach 3 Std.	0,4	
10. 8 ccm Ferment	sofort	1,8?	
10a. 7 ccm „	nach 3 Std.	5,55	
11. 25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol		0,25	
Neue Emulsion:			
10 ccm Emulsion		0,45	
10 ccm „ + 8 ccm Ferment		5,95	
8 ccm Ferment mit Aether + Alkohol		5,2	
8 ccm Ferment mit Wasser		2,0	

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass in solchen Fällen, in denen das Ferment selbst eine hohe Acidität besitzt oder in den Mengenversuchen, bei denen zur Feststellung der Abhängigkeit grosse Fermentmengen verwendet werden mussten, offenbar ganz falsche Werte erhalten wurden. So ist im Versuch III, bei dem der stark saure Wasserextrakt eines Pankreasbreies verwendet wurde, der 24 Std. gelegen hatte, die Berechnung absolut unsicher, besonders auch noch darum, weil z. T. eine konzentriertere Titrierlauge genommen werden musste, um nicht zu grossen Wassergehalt und dadurch be-

dingte Inhomogenität des zu titrierenden Gemisches hervorzurufen. Ähnlich war es auch mit anderen Versuchen; beispielsweise ist auch das Resultat von Versuch IVa unsicher.

Es kommt nämlich noch ein anderer Umstand hinzu; im Versuch IVa hatte ich zufällig die Titration der Fermentlösung ohne Zusatz von Äther und Alkohol vorgenommen, in dem Versuch IVb dagegen, der mit einem in genau gleicher Weise hergestellten Extrakt aus demselben Pankreastrockenpulver angestellt war, hatte ich diesen Ätheralkoholzusatz wie gewöhnlich vorgenommen und dabei einen wesentlich höheren Wert erhalten. Ich überzeugte mich sofort davon, dass auch in diesem Falle (IVb) die Fermentlösung in Verdünnung mit Wasser einen wesentlich niederen Aciditätswert hatte, fast den gleichen wie in dem früheren Versuche (IVa).

Dieser Umstand, den ich bald erörtere, macht alle Mengenversuche aus dieser Zeit wenig brauchbar, während bei den Zeitversuchen und in den Glycerinversuchen sich der Fehler, da stets die gleiche Fermentmenge verwendet wurde, in den Einzelversuchen wohl in gleicher Weise geltend macht; in diesen Versuchen wird sich der Fehler also von selbst eliminieren.

Damit konnte sich aber die vereinfachte Titriermethode überhaupt als unbrauchbar erweisen, jedenfalls war eine Untersuchung nach der Ursache der Erscheinung und nach der Art, wie die Acidität sicher oder wenigstens sichere Vergleichswerte bestimmt werden konnten, unbedingt notwendig. Die hierher gehörigen Untersuchungen folgen im zweiten Hauptabschnitt der Arbeit.

Unter den bis jetzt mitgeteilten Versuchen befinden sich bereits einige, welche dartun, dass entgegen der Annahme mancher Autoren (Volhard, Engel) der Zusatz von Glycerin, also des einen Spaltungsproduktes, die Verseifung durch das Ferment gestört und gänzlich gehemmt werden kann; dies ist natürlich methodisch von Bedeutung, weil es einigermassen gegen die Verwendung des Glycerins als Extraktionsmittel spricht.

Weil aber diesem ersten Versuche der genannte Fehler der Titration anhaftet, habe ich später, als die Methode auch nach dieser Richtung mehr gesichert war, derartige Versuche wiederholt; ich gebe sie in Abschnitt III dieser Arbeit.

Eine besondere Versuchsreihe stellten wir an, um herauszufinden, worüber in der Literatur Unklarheiten und Meinungsverschiedenheiten bestehen, auf welche Weise man am besten

ein gut wirksames und für die Lösung der Hauptfrage geeignetes Fermentpräparat erhält. Die diesbezüglichen Feststellungen folgen im IV. Teil.

Endlich war es wichtig, eigene Erfahrung darüber zu sammeln, welches Substrat für die Versuche am zweckmässigsten zu wählen ist. Ich habe darum eine Reihe von Emulsionen durchprobiert; dies war umso nötiger, als ich im Anfang meiner Untersuchung nur mit schwachen Fermentlösungen arbeitete und dabei die Beachtung machen musste, dass z. B. reines Olivenöl oder Seifenemulsionen von Olivenöl nicht verdaut wurden. Die hierher gehörigen Versuche bespreche ich im V. Abschnitt.

Die Untersuchungen sämtlicher 5 Abschnitte mussten neben einander herlaufen und in einander eingreifen, und so konnte ich in der einen Versuchsreihe die Erfahrungen aus der anderen erst allmählich verwerten. Das wesentliche Resultat der Arbeit möchte ich voranschicken, dass ich für die Versuche die direkte Titriermethode in alkoholisch-ätherisch-wässeriger Lösung sehr wohl brauchbar halte. Denn es darf nicht verkannt werden, dass auch die vorhergehende Äther-Extraktion absolut genaue Resultate nicht liefert und dass bei einer grösseren Anzahl gleichzeitig auszuführender Bestimmungen, wie es für die Zeit- und Mengenversuche nötig ist, die quantitative Genauigkeit der Einzelbestimmungen noch mehr leiden muss, während die einfachere Titration natürlich in relativ kurzer Zeit sich an zahlreichen Einzelversuchen ausführen lässt. Für derartige Versuche muss man sich, will man nicht zu lange Zeit darauf verwenden, mit einer annähernden Bestimmung und ungefähren Übersicht begnügen. Leider habe ich schliesslich den Vergleich der direkten Titrierung mit den Resultaten nach vorheriger Extraktion nicht mehr durchführen können.

II. Prüfung der direkten Titriermethode auf ihre Brauchbarkeit.

Veranlassung für diesen Teil der Untersuchung hatte der oben erwähnte Befund gegeben, dass die Fermentlösung, in rein wässriger Lösung titriert, einen wesentlich anderen Wert lieferte als in der gewöhnlich gebrauchten Mischung mit 25 ccm Äther und 30 ccm Alkohol.

Die Ursache dieses Verhaltens kann nichts anderes sein

als die in dem einen und anderen Falle verschieden starke Hydrolyse, welche dem das Wesen der Titration ausmachenden Neutralisationsvorgang mehr oder weniger stark entgegenwirkt.

Nach der neueren Theorie der Indikatoren beruht der Farbenumschlag des Indikators — in unserem vorliegenden Fall des Phenolphtaleins — darauf, dass, solange noch Säure, d. h. freie H-Ionen in der Lösung vorhanden sind, die an und für sich geringfügige elektrolytische Dissociation des Indikators — Phenolphtalein ist in diesem Sinne eine schwache Säure — zurückgedrängt wird; die Lösung bleibt darum farblos, da das nicht dissoziierte Molekül des Phenolphtaleins keine Eigenfarbe besitzt. Sobald aber der Neutralisationspunkt erreicht ist oder besser eine Spur von OH-Ionen im Überschuss vorhanden sind, tritt die elektrolytische Dissociation des damit gebildeten Salzes des Phenolphtaleins auf, und da das negative Ion des Phenolphtaleins intensiv rot gefärbt ist, erscheint die rote Farbe.

Das ist der Fall, wenn es sich um starke oder mittelstarke Säuren handelt; kommt aber eine schwache Säure in Frage, so spielt die Hydrolyse stark mit in den Vorgang hinein.

Die Reaktionen, die sich bei der Titration zwischen den Molekülen und Ionen der schwachen Säure — SH — und der zur Titration verwendeten Base — BOH — abspielen, sind in folgenden fünf Gleichungen ausgedrückt:

I. $SH = \overset{-}{S} + \overset{+}{H}$ wenig in ——> Richtung.

II. $BOH = \overset{-}{OH} + \overset{+}{B}$ stark in ——> Richtung.

III. $SB = \overset{-}{S} + \overset{+}{B}$

IV. $H_2O = \overset{-}{OH} + \overset{+}{H}$ stark in <—— Richtung.

V. $SB + H_2O = SH + BOH$

Weil die Dissociation der Säure gering und die der Base BOH stark ist, werden an einem Punkte, wo nahezu gleiche Äquivalente Säure und Base noch mit einem Überschuss an Säure in der Lösung sind, also schon etwas vor dem Neutralisationspunkte, die elektrolytischen Dissociationsprodukte des sich bildenden Salzes (Gleichung III) mit denen des Wassers (Gleichung IV) reagieren in umgekehrter Richtung der Gleichung I und II. Die Säure soll nur nach unserer Annahme schwach i. e. wenig dissociiert sein; es ist also in

der Lösung ein Teil der Säuremoleküle als solcher gelöst, also im neutralen Zustand ohne freie H-Ionen. Die Base soll stark sein d. h. so gut wie sämtliche Moleküle sind dissociiert; es müssen also relativ viel freie OH-Ionen vorhanden sein; sie finden nicht die nötigen freien H-Ionen in genügender Menge vor, um mit ihnen im Sinne der Gleichung IV zu reagieren, da die H-Ionen an den Säurerest zum neutralen Molekül verankert sind. Die Gleichung ist demnach für unsern Fall angenähert folgendermassen aufzufassen.

$$\text{V. } SB + H_2O = SH + \overset{+}{B} + \overset{-}{OH}$$

Die wegen der Hydrolyse freigewordenen und freibleibenden OH-Ionen rufen also den Farbenumschlag des Indikators schon vor dem Neutralisationspunkt hervor. Gleichzeitig ist klar, warum starke Säuren sich nicht so verhalten, warum also hierbei die Hydrolyse nicht diesen Einfluss hat; denn in dem Falle, wo es sich um starke Säuren handelt, finden die OH-Ionen der Base die korrespondierenden H-Ionen der Säure vor. Für den Grad der Hydrolyse spielt natürlich die Menge des zur Lösung verwendeten Wassers eine Rolle; in dem Masse aber, als man das Wasser durch ein anderes Lösungsmittel z. B. Alkohol ersetzt, wird die Hydrolyse auch bei schwachen Säuren hintangehalten werden müssen; der Umschlag wird also dann richtig am Neutralisationspunkt erfolgen und nicht vor diesem. Dabei wirkt noch begünstigend mit, dass die elektrolytische Dissociation der Base in diesem Lösungsmittel gegenüber Wasser vermindert sein kann. In ähnlicher Weise kann der Zusatz von sonst indifferenten Salzen wirken, wenn sie die Dissociation der Base zurückdrängen bezw. dadurch, dass sie ihr Anion enthalten. In beiden Fällen wird mit der Einschränkung der Dissociation der Base die Zahl der OH-Ionen vermindert und damit wird bei der Titration der Umschlag erst bei höheren Werten erfolgen. Wenn also in unserem spez. Fall in dem Gemenge, das die Fermentlösung darstellt, Säuren mit geringer elektrolytischer Dissociation vorhanden sind, so werden wir nach der Theorie erwarten müssen, in rein wässriger Lösung geringere Säurenwerte bei der Titration zu erhalten als in der alkoholisch-ätherisch-wässrigen Lösung. Das ist die Erfahrung, die wir gemacht haben. Dem richtigen Wert für die Acidität kommen, das geht aus

den allgemeinen Ausführungen hervor, unstreitig die Titrationen in alkoholischer-ätherischer Lösung näher; absolut richtig sind sie aber in der Regel nicht zu erhalten, weil stets etwas Wasser in den Gemischen enthalten ist, einmal ist das Wasser für den Versuch während der Dauer der Fermentwirkung nötig, zum anderen kommt es durch die Titrierflüssigkeit hinein. Eine Titration mit alkoholischer Lauge verbietet sich von selbst mit Rücksicht auf die dadurch ausgefällten Eiweisskörper. Die durch den Alkoholzusatz ausfallenden eiweissartigen Körper werden bei der Titration bei einigem Schütteln von wässriger Lauge noch leicht durchdrungen; dies würde bei alkoholischer Lauge nicht mehr der Fall sein.

Weil nun das Wasser unter den Bedingungen, mit denen wir arbeiten, immer zugegen sein muss, ist es nicht ausführbar, das Minimum der Hydrolyse zu erreichen; man muss das Maximum anstreben, und es fragt sich, abgesehen von der Art der Säuren, die in unserem Falle die ganze Erscheinung bedingen: erfolgt dabei, sonst gleiche Umstände vorausgesetzt, der Umschlag proportional mit der Säuremenge? dann würde die einfachere Titrationsmethode ohne vorhergehende Aetherextraktion, wie ich sie verwendet hatte, mit geringen Abänderungen auch weiter brauchbar sein. Das war also zunächst experimentell zu prüfen. Zunächst habe ich mich davon überzeugt, dass es für Schwefelsäure keinen Unterschied macht, ob die Titration in wässriger Lösung oder nach Zusatz von 25 ccm Äther + 30 ccm Alkohol ausgeführt wird.

Weiter wurden dann Versuche angestellt mit einer in Alkohol, Äther und in Wasser in gleicher Weise löslichen Säure; dazu wurde die Essigsäure gewählt.

Essigsäure.

20 ccm der 50 %igen Essigsäure des Handels werden in 500 ccm Alkohol gelöst und dann auf 1000 ccm mit Aether aufgefüllt.

Bei der Alkohol-Aether-Verdünnung wurde die Titration mit wechselndem Wasserzusatz — 0, 10, 20 ccm — vorgenommen. Als Titrierflüssigkeiten wurden benutzt: die gewöhnliche $\frac{n}{10}$ Normallauge, ferner eine etwa 10 mal stärkere Natronlauge und schliesslich Natriumäthylat. Der Titre der starken Natriumlauge und des Natriumäthylats wurde durch besondere Titrationen bestimmt. In einigen Versuchen wurde auch eine alkoholische Natronlauge verwendet. Letztgenannte Titrierflüssigkeiten wurden angewendet um das Wasser nach Möglichkeit aus der titrierten Lösung fernzuhalten. In der letzten Kolumne sind die Umrechnungen für $\frac{n}{10}$ Lauge vorgenommen; dabei bemerke

ich, dass ein Fehler von 1 Tropfen starker Lauge = 0,5 $\frac{n}{10}$ Lauge ausmacht.

I.

			$\frac{n}{10}$ Lauge
20 ccm	ohne Wasser titriert		35,0
	mit 10 „ „		35,25
	„ 20 „ „		35,15
		Mittel:	35,15
	starke Lauge		
	ohne Wasser „	3,25	34,9
	mit 10 „ „	3,30	35,4
	„ 20 „ „	3,25	34,9
	Na-äthylat		
	ohne Wasser „	20,6	34,7
	mit 10 „ „	20,55	34,5
	„ 20 „ „	20,5	34,5
10 ccm	ohne Wasser titriert		17,65
	mit 10 „ „		17,55
	„ 20 „ „		17,70
		Mittel:	17,65
	starke Lauge		
	ohne Wasser „	1,7	18,2
	mit 10 „ „	1,65	17,7
	„ 20 „ „	1,65	17,7
	Na-äthylat		
	ohne Wasser „	10,25	17,2
	mit 10 „ „	10,35	17,4
	„ 20 „ „	10,30	17,3
5 ccm	ohne Wasser titriert		8,9
	mit 10 „ „		8,95
	„ 20 „ „		8,95
		Mittel:	8,95
	starke Lauge		
	ohne Wasser „	0,8	8,6
	mit 10 „ „	0,85	9,1
	„ 20 „ „	0,85	9,1
	Na-äthylat		
	ohne Wasser „	5,2	8,7
	mit 10 „ „	5,2	8,7
	„ 20 „ „	5,2	8,7

40,35 $\frac{n}{10}$ Säure : 3,8 starke L.

34,7 „ : 3,2 „

31,85 „ : 19,0 Na-äthylat

20,6 „ : 12,2 „

Es macht für Essigsäure keinen Unterschied, ob mit Wasserzusatz oder ohne Wasserzusatz titriert wurde; die Werte schwanken um geringe Beträge nach beiden Seiten; dass die Titrationen mit Na-äthylat eine Spur geringere Werte liefern als die Titrationen mit den wässerigen Laugen, beruht natürlich auf einer geringfügigen Esterbildung, die sich in diesem Sinne geltend machen muss.

Im übrigen zeigt die Vergleichung der Mittelwerte von der Titration mit gewöhnlicher $\frac{n}{10}$ Lauge, dass vollständige Proportionalität für Säuren von der Stärke der Essigsäure besteht, wenn man den für 25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol regelmässig erhaltenen Wert von 0,15—0,25 [1]) von diesen Werten abzieht.

5 ccm	Säure	brauchen	8,95—0,25 = **8,7**
10 ccm	„	„	17,65—0,25 = **17,5**
20 ccm	„	„	35,15—0,25 = **34,9**

Gleichzeitig ist aus dem Ergebnis dieses Versuchs der Schluss zu ziehen, dass Säuren von der Stärke der Essigsäure nicht die Unstimmigkeit in unserer Fermentlösung bestimmt haben können, welche die Veranlassung für diese Untersuchung gab.

Höhere Fettsäuren.

Es war nun das Augenmerk auf die höheren Fettsäuren zu richten, weil diese einen beträchtlichen Teil der bei der Titration zu bestimmenden Säuren ausmachen.

Ich habe mir zu diesem Zweck aus dem verwendeten Olivenöl die Fettsäuren desselben dargestellt und mit diesen in derselben Weise Versuche angestellt, wie ich sie vorher bei der Essigsäure beschrieben habe. Die Darstellung der Fettsäuren geschah folgendermassen:

Es wurden 200 ccm Olivenöl in Alkohol gelöst, mit alkoholischer Kalilauge nach der Vorschrift von Salkowski verseift unter Erwärmen; nach dem Abkühlen wurden die Seifen durch H_2SO_4 zerlegt, vom

---

[1]) 25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol ohne Wasser 0,3 $\frac{n}{10}$ L.
mit 10 „ 0,25 „
„ 20 „ 0,25 „
„ 30 „ 0,30 „
bisweilen auch 0,15; 0,2 „

Kaliumsulfat abfiltriert und mit Aether 2 mal ausgeschüttelt. Die Aether-Extrakte wurden alsdann mit H_2O solange gewaschen, bis das Wasser neutral reagierte. Zum Schlusse wurde der Aether verjagt. — Später habe ich dann statt dessen von Merck bezogene Palmitinsäure verwendet.

II.

10 ccm Fettsäure aus Olivenöl mit Aether auf 100 aufgefüllt.

5 ccm Oelsäure-Aether + 20 ccm Aether + 30 ccm Alkohol

		$\frac{n}{10}$ L.
ohne Wasser titriert		14,7
mit 10 „ „		15,0
„ 20 „ „		15,0
„ 30 „ „		15,0
	st. L.	
ohne Wasser „	2,15	16,6
mit 10 „ „	2,10	
„ 10 „ „	2,10	

40,0 $\frac{n}{10}$ Säure : 5,2 st. L.
48,0 „ : 6,15 „

III.

3,203 g Palmitinsäure Merck in 250 ccm Aether gelöst etwa = $^1/_{10}$ Normal.

a) 10 ccm Fetts.-Aether + 15 ccm Aether + 30 ccm Alkohol

		$\frac{n}{10}$ L.
ohne Wasser titriert		4,7
mit 10 „ „		4,7
„ 20 „ „		4,7
„ 30 „ „		4,8
+ 60 ccm Alkohol „ 10 „ „		4,75
	Mittel:	4,7
	st. L.	
ohne Wasser „	0,65	4,9
mit 10 „ „	0,6	4,6

b) 20 ccm fetts. Aether + 5 ccm Aether + 30 ccm Alkohol

ohne Wasser titriert	9,55
mit 10 „ „	9,60
„ 20 „ „	9,65
Mittel:	9,6

st. L.

ohne Wasser titriert 2,25—20,6 $\frac{n}{10}$ S. 9,0

mit 10 „ „ 0,8 — 1,0 $\frac{n}{10}$ S. 9,53

Alkohol-NaL

ohne Wasser „ 5,3 — 1,2 $\frac{n}{10}$ S. 9,54

mit 10 „ „ 4,7 9,52

25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol ohne Wasser 0,15

Aus diesen beiden Versuchen ergiebt sich:

10 ccm Säure brauchen 4,70 — 0,15 = 4,55

20 ccm „ „ 9,60 — 0,15 = 9,45

67,8 $\frac{n}{10}$ Säure : 5,15 st. L.

47,35 „ : 3,55 „

31,8 „ : 15,7 alkohol. NaL

43,7 „ : 21,6 „ „

IV.

6,406 Palmitinsäure Merck in 250 ccm Aether gelöst etwa = $\frac{1}{10}$ Normal.

$\frac{n}{10}$ L.

20 ccm fetts. Aether + 5 ccm Aether + 30 ccm Alkohol

ohne Wasser titriert 15,65

mit 10 „ „ 15,65

„ 20 „ „ 15,80

st. L.

ohne Wasser „ 1,5 16,5

mit 10 „ „ 1,8 — 3,0 $\frac{n}{10}$ S. 16,4

alkohol. NaL.

ohne Wasser „ 7,7 15,6

mit 10 „ „ 8,15 — 0,95 $\frac{n}{10}$ S. 15,55

„ 20 „ „ 8,0 — 8,35 $\frac{n}{10}$ S. 15,8

„ 30 „ „ 7,95 — 0,2 $\frac{n}{10}$ S. 15,9

V.

a) 6,406 Palmitinsäure Merck mit Aether auf 250 ccm aufgefüllt.

$\frac{n}{10}$ L.

20 ccm fetts. Aether + 5 ccm Aether + 30 ccm Alkohol

ohne Wasser titriert 18,45

mit 10 „ „ 18,45

M. 18,45

	st. L.	$\frac{n}{10}$ L.
ohne Wasser titriert	1,65	18,03
mit 10 „ „	1,7	18,6
	Na-äthylat	
ohne Wasser „	17,7	18,61
mit 10 „ „	17,7	18,61

b) Von der Lösung sub a 25 ccm mit Aether auf 25 ccm aufgefüllt = etwa $\frac{n}{100}$ Normal.

20 ccm fetts. Aether + 5 ccm Aether + 30 ccm Alkohol

ohne Wasser titriert		2,15
mit 20 „ „		2,20
		M. 2,15
	$\frac{n}{100}$ L.	
ohne Wasser „	22,0	2,11
mit 20 „ „	21,9	2,10
	Na-äthylat	
ohne Wasser „	2,05	2,16
mit 20 „ „	2,05	2,16

4,15 $\frac{n}{10}$ Säure	:	43,6 $\frac{n}{100}$ L.	
4,25 „	:	44,15 „	
20,4 „	:	19,6	Na-äthylat
27,3 „	:	25,6	„
25,5 „	:	24,3	„

Aus diesem Versuch ergiebt sich im Mittel abzüglich von 0,25 für Aether und Alkohol:

für 20 ccm der unverdünnten Lösung = 18,45 — 0,25 = 18,2
„ „ „ „ 10 f. „ „ = 2,15 — 0,25 = 1,9

VI.

6,406 g Palmitinsäure werden mit Aether auf 250 ccm aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 10 und 5 ccm mit 20 ccm Aether und 30 ccm Alkohol titriert.

		st. L.	$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm ohne Wasser titriert			9,35
mit 20 „ „			9,4
			M. 9,35
ohne Wasser „		0,95	10,2
mit 20 „ „		0,9	9,7
		Na-äthylat	
ohne Wasser „		5,35	9,0
mit 20 „ „		5,35	9,0
5 ccm ohne Wasser „			4,7
mit 20 „ „			4,75
			M. 4,75

	titriert	st. L.	$\frac{n}{10}$ L.
ohne Wasser	„	0,45	4,8
mit 20 „	„	0,45	4,8
		Na-äthylat	
ohne Wasser	„	2,8	4,7
mit 20 „	„	2,8	4,7

Von obiger Lösung wurden ferner titriert 20 ccm mit 5 ccm Aether + 30 ccm Alkohol + 20 ccm Wasser.

20 ccm	+ 20 Wasser		= 18,15 $\frac{n}{10}$ L.	
	+ 20 „	= 1,75 st. L.	= 18,8	„
	+ 20 „	= 10,8 Na-äthylat	= 18,3	„
30 ccm	+ 20 „	= 2,65 st. L.	= 28,5	„

Die Proportionalität ist bei der Titration mit $\frac{n}{10}$ Lauge gewahrt.

5 ccm	4,75 — 0,25	für Alkohol-Aether	4,5
10 ccm	9,35 — 0,25	„	9,1
20 ccm	18,15 — 0,25	„	17,9

VII.

Palmitinsäure Merck wird im Vacuum über H_2SO_4 getrocknet; dies ist in der Regel mit dem Präparate nicht geschehen, daher die etwas verschiedenen Werte der zu verschiedenen Zeiten gefertigten Lösungen. 12,812 g dieser getrockneten Palmitinsäure auf 500 ccm mit Aether aufgefüllt etwa = $\frac{1}{10}$ Normal.

			$\frac{n}{10}$ L.
20 ccm	ohne Wasser	titriert	18,95
	mit 10 „	„	18,95
	„ 20 „	„	18,85
			M. 18,9

		st. L.	
ohne Wasser	„	1,8	?19,4
mit 10 „	„	1,75	18,9
„ 20 „	„	1,75	18,9
		Na-äthylat	
ohne Wasser	„	11,0	18,5
mit 10 „	„	11,0	18,5
„ 20 „	„	11,0	18,5

10 ccm	ohne Wasser	titriert	9,45
	mit 10 „	„	9,45
	„ 20 „	„	9,45
			M. 9,45

			$\frac{n}{10}$ L.
	titriert	st. L.	
ohne Wasser	„	0,9	9,7
mit 10 „	„	0,9	9,7
„ 20 „	„	0,9	9,7
		Na-äthylat	
ohne Wasser	„	5,5	9,2
mit 10 „	„	5,5	9,2
„ 20 „	„	5,5	9,2
5 ccm ohne Wasser	titriert		4,9
mit 10 „	„		4,95
„ 20 „	„		4,95
			M. 4,95
		st. L.	
ohne Wasser	„	0,45	4,85
mit 10 „	„	0,5 übertitriert	?5,4
„ 20 „	„	0,45	4,85
		Na-äthylat	
ohne Wasser	„	2,75	4,6
5,05 ccm mit 10 „	„	2,85	4,8
„ 20 „	„	2,85	4,8

58,6 $\frac{n}{10}$ S. : 5,45 st. L.
44,9 „ : 4,15 „
37,6 „ : 22,5 Na-äthylat
33,9 „ : 20,5 „
38,8 „ : 22,5 „
28,6 „ : 16,9 „

Im Mittel beträgt also der Säurewert nach Abzug von 0,25 für Aether + Alkohol:

für 5 ccm = 4,95 — 0,25 = 4,7
„ 10 ccm = 9,45 — 0,25 = 9,2
„ 20 ccm = 18,9 — 0,25 = 18,65

VIII.

Neue Palmitinsäurelösung; 6,406 Palmitinsäure mit Aether auf 250 ccm aufgefüllt; von dieser Lösung 50 ccm wieder mit Aether auf 250 ccm aufgefüllt. Diese letzte verdünnte Lösung wird mit 20 ccm Aether und 30 ccm Alkohol titriert.

			$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm ohne Wasser	titriert		2,0
mit 20 „	„		2,0
		$\frac{n}{100}$ L.	
ohne Wasser	„	20,2	1,8
mit 20 „	„	20,3	1,8
		Na-äthylat	
ohne Wasser	„	1,2	2,0
mit 20 „	„	1,2	2,0

			$\frac{n}{10}$ L.
5 ccm	ohne Wasser titriert		1,05
	mit 20 „ „		1,1
		$\frac{n}{100}$ L.	
	ohne Wasser „	10,85	0,96
	mit 20 „ „	11,0	0,97
		Na-äthylat	
	ohne Wasser „	0,65	1,1
	mit 20 „ „	0,6	1,0
			$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm	ohne Wasser titriert		1,95
	mit 20 „ „		1,95
			M. 1,95
		$\frac{n}{100}$ L.	
	ohne Wasser „	20,05	1,8
	mit 20 „ „	19,70	1,7
		Na-äthylat	
	ohne Wasser „	1,55 übertitriert	2,6
	mit 20 „ „	1,15	1,9
5 ccm	ohne Wasser „		1,0
	mit 20 „ „	übertitriert	1,15
			M. 1,1
		$\frac{n}{100}$ L.	
	ohne Wasser „	10,65	0,94
	mit 20 „ „	10,80	0,95
		Na-äthylat	
	ohne Wasser „	0,65	1,1
	mit 20 „ „	0,85 stark übertitriert	1,3

20 ccm + 5 Aether + 30 Alkohol + 20 Wasser

—	4,0 $\frac{n}{10}$ L.	= 4,0
=	38,4 $\frac{n}{100}$ L.	= 3,4
=	2,2 Na-äthylat	= 3,7

Die Berechnung der Säurewerte ergibt nach Abzug von 0,25 für Aether-Alkohol

5 ccm	1,1 — 0,25	0,85
10 ccm	1,95 — 0,25	1,7

Phosphorsäure.

Es musste also nach einer anderen die Unstimmigkeit hervorrufenden Säure weiter gesucht werden.

Als Beispiel einer schwachen Säure, von der aus der

Hydrolyse sich ergebende Störungen bei der Titration bekannt sind, wurde Phosphorsäure gewählt.

Die Lösung der Phosphorsäure wurde für die Titrierversuche mit gleichen Mengen Alkohol und Aether vorgenommen, anfangs im Verhältnis 9,4 : 250; später im Verhältnis 10 : 250.

20 ccm Phosphorsäure mit Wasser aufgefüllt auf 500 ccm.
Bei der Titration dieser Lösung brauchten:

5 ccm	12,5 ;	12,7;	12,55;	Mittel 12,6
10 ccm	24,95;	25,2;	25,15	„ 25,1
20 ccm				„ 49,7

Die Bestimmung des Phosphorsäuregehaltes in einer 2. gleichfalls im Verhältnis 20 : 500 angesetzten Lösung ergab folgende Werte:

49,5 ccm lieferten 0,6868 $Mg_2P_2O_7$
41,0 ccm „ 0,5686 „
10 ccm der Lösung enthielten also bezüglich
0,9126 H_3PO_4
0,9122 „
also 0,931 $\frac{Mol.}{10}$ H_3PO_4.

Es würden also von dieser Lösung (10 : 250)

H_3PO_4 als einbasische Säure brauchen 10 ccm 9,3 $\frac{n}{10}$ L. 20 ccm 18,6 $\frac{n}{10}$ L.
„ „ zweibasische „ „ 10 ccm 18,6 „ 20 ccm 37,2 „
„ „ dreibasische „ „ 10 ccm 27,9 „ 20 ccm 55,9 „

Versuchsreihe IX.

9,4 ccm offic. Phosphorsäure gelöst in 125 ccm Alkohol mit Aether auf 250 ccm aufgefüllt. Von dieser Lösung (9,4 : 250) verlangen zur Absättigung

H_3PO_4 als einbasische Säure 10 ccm 8,8 $\frac{n}{10}$ L. 20 ccm 17,5 $\frac{n}{10}$ L.
„ „ zweibasische „ 10 ccm 17,5 $\frac{n}{10}$ L. 20 ccm 35,0 $\frac{n}{10}$ „
„ „ dreibasische „ 10 ccm 26,3 $\frac{n}{10}$ L. 20 ccm 52,5 $\frac{n}{10}$ „

Nach den Werten 49,7 respektive 25,1 für die Verdünnung 10 : 250 berechnet würden von rein wässeriger Lösung in der Konzentration 9,4 : 250 gebrauchen

10 ccm 23,5 $\frac{n}{10}$ L.

20 ccm 46,7 $\frac{n}{10}$ L.

Die Titrierung der Phosphorsäurelösung geschah bei 20 ccm Phosphorsäurelösung mit 15 ccm Aether + 20 ccm Alkohol; bei 10 ccm Phosphorsäurelösung wurde titriert mit 20 ccm Aether + 25 ccm Alkohol.

Phosphorsäurelösung.

			$\frac{n}{10}$ L.
20 ccm	ohne Wasser		47,4
	mit 10 „		46,7
	„ 20 „		46,5
		st. L.	
	ohne Wasser	5,4	58,3
	mit 10 „	5,9—9,4 $\frac{n}{10}$ S.	54,2
		alkohol. L.	
	ohne Wasser	29,55	59,7
	mit 10 „	28,15	55,6
	„ 20 „	25,40	51,3
	„ 30 „	24,70	49,8

32,3 $\frac{n}{10}$ S. : 3,0 st. L.
41,0 „ „ : 3,8 „ „
31,5 „ „ : 15,5 alkohol. L.
30,1 „ „ : 14,95 „ „

Phosphorsäurelösung (neuhergestellt).

			$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm	ohne Wasser		23,3
	mit 10 „		23,5
	„ 20 „		23,3
		st. L.	
	ohne Wasser	2,95	31,7
	mit 10 „	2,7	29,5
	„ 20 „	2,3	25,7
		Na-äthylat	
	ohne Wasser	26,6	27,3
	mit 10 „	26,8	28,2
	„ 20 „	25,2	26,5
	„ 30 „	23,8	24,5
	„ 40 „	22.2	23,4
	„ 50 „	22,2	23,4

44,1 $\frac{n}{10}$ S. : 4,0 st. L.
30,9 „ S. : 2,85 „
20,4 „ S. : 19,6 Na-äthylat
27,3 „ S. : 25,6 „
25,5 „ S. : 24,3 „

Dieser Versuch zeigt, dass mit steigendem Wasserzusatz geringere Werte erhalten werden, weniger bei der Titration mit wässeriger $\frac{n}{10}$ L. als mit der starken L. und dem Aethylat

Dabei liegen die höchsten Werte für starke L. und Na-äthylat beträchtlich über dem für dreibasische Säure zu erwartenden Aciditätswert. Es fällt im Anfang Salz aus; die Lösung trübt sich, z. T. sehr stark. Dieser Umstand, sowie die zurückgedrängte Dissociation in der alkohol. Lösung können Veranlassung dafür geben, dass Werte erheblich über den Aciditätswert hinausgehen.

Der Endwert für 10 ccm Säure ist bei Na-äthylat erst nach 40 ccm Wasserzusatz erreicht. Bei der Titrierung mit starker Lauge ist für 20 ccm Säure, wie es scheint, der Endwert überhaupt nicht erreicht, da man mit dem Wasserzusatz nicht genügend hoch gegangen war.

Die Titration mit $\frac{n}{10}$ Lauge gibt merkwürdigerweise für 20 ccm zunächst einen zu hohen Wert. Im übrigen besteht Proportionalität in beiden Versuchen:

10 ccm	**23,4**	— **0,20** für Alk. Aether	**23,2**
20 ccm	**46,6**	— **0,20** „ „ „	**46,4**

Versuchsreihe X.

20 ccm Phosphorsäure gelöst in 250 ccm Alkohol mit Aether auf 500 ccm aufgefüllt; Phosphorsäure titriert in 25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol.

		$\frac{n}{10}$ L.
20 ccm ohne Wasser		50,2
mit 10 „		50,3
„ 20 „		50,3
„ 30 „		50,2
	st. L.	
ohne Wasser	5,5	59,8
mit 10 „	5,2	56,5
„ 20 „	5,05	54,9
„ 30 „	4,75	51,6
„ 40 „	4,75	51,6
	Na-äthylat	
ohne Wasser	45,5	60,5
mit 10 „	44,4	59,0
„ 20 „	41,2	54,8
„ 30 „	40,35	53,6
„ 40 „	39,05	51,9
„ 50 „	38,35	51,0
„ 60 „	37,55	49,9
„ 70 „	37,25	49,6
„ 80 „	37,35	49,7
„ 90 „	37,30	49,6

		$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm ohne Wasser		25,8
mit 10 „		25,4
„ 20 „		25,4
	st. L.	
ohne Wasser	3,2	34,8
mit 10 „	2,8	30,4
„ 20 „	2,45	26,6
„ 30 „	2,35	25,5
„ 40 „	2,35	25,5
	Na-äthylat	
ohne Wasser	23,85	31,7
mit 10 „	21,95	29,1
„ 20 „	20,7	27,5
„ 30 „	20,0	26,6
„ 40 „	19,0	25,3
„ 50 „	18,9	25,1
5 ccm ohne Wasser		13,5
mit 10 „		12,85
„ 20 „		12,9
	st. L.	
ohne Wasser	1,4	14,8
mit 10 „	1,35	14,3
„ 20 „	1,25	13,3
„ 30 „	1,15	12,2
„ 40 „	1,15	12,2
	Na-äthylat	
ohne Wasser	11,75	15,6
mit 10 „	10,55	14,0
„ 20 „	9,85	13,4
„ 30 „	9,40	12,5
„ 40 „	9,45	12,6

38,9 $\frac{n}{10}$ S. : 3,6 st. L.
34,4 „ : 3,15 „ „
29,05 „ : 21,85 Na-äthylat.

Leider ist bei der 20 ccm-Titration mit starker Lauge der Wasserzusatz nicht bis zu Ende durchgeführt wegen der scheinbar eingetretenen Konstanz. Sonst zeigt sich, dass bei den höheren Säuremengen auch höhere Wassermengen für die maximale Hydrolyse nötig sind; für 20 ccm zwischen 70 und 80, für 10 ccm zwischen 40 und 50, für 5 ccm zwischen 20 und 30.

Ferner wird auch bei der $\frac{n}{10}$ Laugentitration für 10 und 5 ccm schon ein Wasserzusatz notwendig, um die maximale Hydrolyse zu bekommen; allerdings ist hierfür nur wenig Wasser nötig, 10 ccm ergaben schon den niedrigsten Wert. Die Werte bleiben aber überhaupt etwas über den spec. mit

Na-äthylat erhaltenen und über denen der korrespondierenden rein wässerigen Lösungen, mit welchen die Na-äthylatwerte übereinstimmen.

Die Proportionalität ist bei der Titration mit $\frac{n}{10}$ Lauge aber auch annähernd erfüllt.

5 ccm	12,9 —0,25	= **12,65**
10 ccm	25,4 —0,25	= **25,2**
20 ccm	50,2 —0,25	= **50,0**

Versuchsreihe XIa.

20 ccm Phosphorsäure gelöst in 250 ccm Alkohol, mit Aether auf 500 ccm aufgefüllt. Phosphorsäure titriert in 25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol.

			$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm	ohne Wasser		**25,1**
	mit „		**25,0**
		st. L.	
	ohne Wasser	**3,5**	**37,5**
	mit 20 „	**2,6**	**27,9**
	„ 40 „	**2,45**	**25,7**
		Na-äthylat.	
	ohne Wasser	**18,2**	**30,5**
	mit 20 „	**16,2**	**27,1**
	„ 40 „	**14,85**	**24,8**
5 ccm	ohne Wasser		**13,2**
	mit 20 „		**12,5**
		st. L.	
	ohne Wasser	**1,65**	**18,1**
	mit 20 „	**1,2**	**12,9**
	„ 40 „	**1,2**	**12,9**
		Na-äthylat.	
	ohne Wasser	**9,75**	**16,3**
	mit 20 „	**7,95**	**13,3**
	„ 40 „	**7,65**	**12,8**

24,0 $\frac{n}{10}$ S.: 4,0 st. L.

35,8 „ „ : 21,4 Na-äthylat.

Versuchsreihe XIb.

50,8 ccm der Phosphorsäurelösung von XIa. gelöst in 100 ccm Alkohol werden mit Aether auf 250 cc aufgefüllt. Phosphorsäuretitration in 25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol.

			$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm	ohne Wasser		6,6
	mit 20 „		5,3
	„ 40 „		5,35
		$\frac{n}{100}$ L.	
	ohne Wasser	55,4	5,3
	mit 20 „	54,9	5,1
		Na-äthylat.	
	ohne Wasser	39,5	6,6
	mit 20 „	3,15	5,3
	„ 40 „	3,15	5,3
5 ccm	ohne Wasser		3,5
	mit 20 „		2,65
	„ 40 „		2,7
		$\frac{n}{100}$ L.	
	ohne Wasser	28,7	2,7
	mit 20 „	27,2	2,6
		Na-äthylat.	
	ohne Wasser	2,0	3,35
	mit 20 „	1,55	2,6
	„ 40 „	1,60	2,7

Die Bemerkungen zu Versuch IX und X wären hier zum Teil zu wiederholen; Proportionalität besteht auch hier nach Abzug von 0,2 für Alkohol und Aether, dem Wert, der für den verwendeten Aether und Alkohol gefunden war.

Versuchsreihe XII a.

20 ccm Phosphorsäure gelöst in 250 ccm Alkohol mit Aether auf 500 ccm aufgefüllt. Phosphorsäure titriert in 25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol.

			$\frac{n}{10}$ L.
20 ccm	ohne Wasser		50,3
	mit 20 „		50,2
	„ 40 „		50,1
	„ 50 „		50,2
		st. L.	
	ohne Wasser	7,1	58,1
	mit 20 „	6,3	51,6
	„ 30 „	6,25	51,2
	„ 40 „	6,2	50,5
	„ 60 „	6,25	51,2
	„ 80 „	6,2	50,5

		Na-äthylat	$\frac{n}{10}$ L.
	ohne Wasser	47,4	55,5
	mit 20 „	43,7	51,1
	„ 30 „	43,8	51,2
	„ 40 „	42,3	49,5
	„ 60 „	40,2	47,0
	„ 80 „	40,25	47,1
10 ccm	ohne Wasser		25,5
	mit 20 „		25,4
	„ 40 „		25,5
		st. L.	
	ohne Wasser	4,2	34,4
	mit 20 „	3,35	27,3
	„ 30 „	3,2	26,2
	„ 40 „	3,15	25,8
	„ 50 „	3,15	25,8
		Na-äthylat	
	ohne Wasser	24,6	28,8
	mit 20 „	21,8	25,5
	„ 30 „		
	„ 40 „	20,7	24,2
	„ 50 „	20,6	24,1
	„ 60 „	20,7	24,2
5 ccm	ohne Wasser		13,5
	mit 20 „		12,8
	„ 40 „		12,8
	„ 60 „	(nicht mehr homogen)	13,1
		st. L.	
	ohne Wasser	2,1	17,2
	mit 20 „	1,6	13,1
	„ 30 „	1,55	12,7
	„ 40 „	1,55	12,7
	„ 60 „	1,6	13,1

	Na-äthylat	
ohne Wasser	12,4	14,5
mit 20 „	10,8	12,6
„ 40 „	10,3	12,1
„ 50 „	10,4	12,2
„ 60 „	11,8 (nicht mehr gemischt).	

Versuchsreihe XII b.

Von der Phosphorsäurelösung a. werden 100 ccm gelöst in 450 ccm Alkohol und mit Aether auf 1000 ccm aufgefüllt.

		$\frac{n}{10}$ L.
20 ccm	ohne Wasser	6,5
	mit 10 „	5,5
	„ 20 „	5,3
	„ 30 „	5,3

		$\frac{n}{100}$ L.	$\frac{n}{10}$ L.
	ohne Wasser	53,8	4,6
	mit 20 „	54,0	4,7
	„ 30 „	54,8	4,7
		Na-äthylat	
	ohne Wasser	5,1	6,0
	mit 20 „	4,3	5,0
	„ 30 „	4,1	4,8
	„ 40 „	4,3	5,0
10 ccm	ohne Wasser		3,55
	mit 10 „		3,1
	„ 20 „		2,8
	„ 30 „		2,75
		$\frac{n}{100}$ L.	
	ohne Wasser	28,2	2,4
	mit 20 „	28,1	2,4
	„ 30 „	29,2	2,5
		Na-äthylat	
	ohne Wasser	2,7	3,2
	mit 10 „	2,4	2,7
	„ 20 „	2,3	2,7
	„ 30 „	2,3	2,8
5 ccm	ohne Wasser		1,9
	mit 10 „		1,6
	„ 20 „		1,5
	„ 30 „		1,5
		$\frac{n}{100}$ L.	
	ohne Wasser	14,4	1,24
	mit 20 „	15,1	1,30
	„ 30 „	15,8	1,36
		Na-äthylat	
	ohne Wasser	1,4	1,6
	mit 10 „	1,25	1,5
	„ 20 „	1,25	1,5
	„ 30 „	1,3	1,5

51,0	$\frac{n}{10}$ S.	:	6,25 st. L.
43,5	„	:	5,3 „
31,8	„	:	3,9 „
37,2	„	:	4,6 „
3,05	„	:	35,8 $\frac{n}{100}$ L.
3,7	„	:	43,0 „
3,65	„	:	43,1 „
39,4	„	:	33,6 Na-äthylat
35,05	„	:	29,4 „
40,0	„	:	34,35 „
34,0	„	:	29,2 „

Wie ich vorher mitgeteilt habe schien es mir, als ob ich bei der Titration mit starker Lauge in den Versuchen IX und X mit dem Wasserzusatz nicht hoch genug gegangen war. Darum habe ich noch weitere Versuche angestellt und dabei auf den Wasserzusatz genau geachtet. Auf Grund der Resultate der letztgenannten Versuche darf ich annehmen, dass auch in den früheren Versuchen jedenfalls das Maximum erreicht war, denn es zeigte sich, dass die Zahlen, die mit starker Lauge erhalten wurden, stets höher lagen, als die mit der schwächeren Lauge bestimmten. Ebenso blieben die mit $\frac{n}{10}$ L. an der 10-fach weiter verdünnten Lösung ermittelten Werte über den Werten, welche durch $\frac{n}{100}$ Lauge an derselben Lösung erhalten wurden. Die Na-äthylatwerte sind durchweg, wie auch in den früheren Versuchen, die niedrigsten (bei entsprechend hohem Wasserzusatz). —

Auch für die letzte Phosphorsäuretitration besteht Proportionalität zwischen den Werten, die mit Normallauge $\left(\frac{n}{10} \text{ L.}\right)$ erhalten wurden, übrigens auch für die Na-äthylatwerte. Die Werte für die starke Lauge zeigen die Proportionalität nicht so gut, wegen der durch die grössere Konzentration bedingten Titrierungenauigkeit.

20 ccm	50,2	— 0,2 für alkohol. Aether	**50,0**
10 ccm	25,5	— 0,2	**25,3**
5 ccm	12,8	— 0,2	**12,6**
2 ccm	5,3	— 0,2	**5,1**
1 ccm	2,8	— 0,2	**2,6**
$^1/_2$ ccm	1,55	— 0,2	**1,35**

Die sämtlichen Phosphorsäureversuche bestätigen die im Eingang zu diesem Teil gebrachten allgemeinen Ausführungen über die schwachen Säuren.

Im vorliegenden Fall der Titration unserer Verdauungsgemische handelt es sich z. T. um Phosphorsäure; sie findet sich in den Pankreasextrakten und kann ausserdem durch die Spaltung des Lecithins in den betreffenden Emulsionen in die Verdauungsgemische gelangen. Es kommen aber noch weitere Säuren ähnlicher Art für die Erklärung der Erscheinung in Betracht, die durch die Selbstverdauung der Pankreas ent-

stehenden Aminosäuren, die vermutlich in derselben Weise das Gleichgewicht bei der Titration beeinflussen, da sie noch weit schwächere Säuren, im modernen Sinne gedacht, darstellen als die Phosphorsäure.

Hinsichtlich der Frage nach Berechtigung und Gültigkeit der Methodik ergibt sich aus den Versuchen, dass der infolge der Hydrolyse in wässriger Lösung erhaltene Minimumwert sich durch Wasserzusatz zu ätherisch alkoholischer Lösung ebenfalls erhalten lässt, und dass man bei der Titration mit $\frac{n}{10}$- Natronlauge diesen Wert bei Zusatz von 20 ccm Wasser sicher erreicht hat, wenn es sich um Säuregrade handelt, die ca. 30 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH erfordern. Man kann also, da dieser Betrag in der Regel bei der Titration der Verdauungsversuche die maximale Acidität ausdrückt, den zu suchenden Aciditätswert mit Leichtigkeit sicher bestimmen, wenn man nach Beendigung der ersten Titration 30—40 ccm Wasser zusetzt und allenfalls zurücktitriert. Es geht nämlich weiter aus den Versuchen hervor, dass der durch Einfluss der Hydrolyse erhaltene Wert proportional ist dem wirklichen Gehalt an Säure.

Am Anfange ist in den Versuchen des III. und IV. Abschnittes dieser Wasserzusatz noch nicht geschehen, später aber regelmässig; dabei hat sich herausgestellt, dass der Fehler, der bei der Titration häufig gemacht wird, mehr dadurch verursacht ist, dass der erste Umschlag des Indikators sehr schwer zu bestimmen ist. Wenn man aber darin erst einige Uebung erlangt hat, gelingt es auch ohne Wasserzusatz den richtigen Punkt zu bestimmen, von dessen Richtigkeit man sich dann aber durch den Wasserzusatz überzeugen kann. Es haben diese Titrationen uns den Eindruck gemacht, dass bezüglich ihrer praktischen Verwertung die Schwierigkeit hauptsächlich mehr darin liegt, den Umschlag rechtzeitig zu erkennen, als an dem Mangel an Wasser, dass durch die Titrierflüssigkeit offenbar in genügender Menge zugebracht wird.

Der Grund mag darin liegen, dass der Gehalt der Ferment-Extrakte an anderen Natronsalzen — dadurch wird die Dissociation der Titrierlauge und der Na-salze der schwachen Säuren zurückgedrängt — die Titrierlauge in ihrer Stärke mehr den zu titrierenden Säuren anpasst; auf diese Weise

kann die Hydrolyse und Dissociation des Indikatorsalzes hintangehalten werden. Durch die Verdünnung wird dies behoben. Darum ist es zweckmässig, nicht von vornherein den Wasserzusatz zu machen, dies noch umsomehr, weil bei höheren Zahlen durch den unnötigen Wasserzusatz eine Entmischung herbeigeführt werden kann.

Die Versuche dieses Abschnittes bestätigen, dass der Alkohol-Aetherzusatz zur Erzielung einer titrierbaren homogenen Mischung statthaft ist, wenn man sich durch nachträglichen Zusatz von ca. 30 ccm Wasser davon überzeugt, dass der richtige Neutralisationspunkt erreicht ist.

Störend bei dieser Titration sind nicht die Fettsäuren, welche sich bei der Verdauung bilden, sondern schwache Säuren wie die Phosphorsäure und event. die Aminosäuren wegen der Hydrolyse ihrer Salze.

Verfährt man in der oben angegebenen Weise, so bestimmt man damit annähernd den Punkt, an dem die Hydrolyse ihr Maximum besitzt. Die so erhaltenen Werte sind gut proportional der in der Lösung enthaltenen Säuremenge.

Bei länger dauernder Extraktion mit Aether würde übrigens auch Phosphorsäure in den Aether-Extrakt übergehen, und es müsste sich in den Aether-Extrakten, wenn auch wahrscheinlich in abgemindertem Grade, der gleiche Fehler geltend machen.

III. Einfluss des Glycerins auf die Fermentwirkung.

Bei den Vorversuchen, von denen einige im ersten Abschnitt mitgeteilt sind, mussten wir uns davon überzeugen, dass ein Glycerinzusatz zu den Fermentlösungen mehr oder weniger hemmend auf ihre fermentative Wirksamkeit einwirkt. Jene Versuche sind noch nicht mit den oben erwähnten Kautelen angestellt worden. Ich habe daher solche Versuche mit der verbesserten Methodik wiederholt.

In der Literatur findet sich inbezug auf diesen Punkt nur die ausdrückliche Angabe Engel's, dass ein hemmender Einfluss des Glycerins auf die Wirkung des Fermentes nicht besteht.

Es folgen zum Belege für meinen eingangs aufgestellten Satz eine Anzahl entsprechender Versuche.

I.

Ferment: Pankreatin Rhenania. Wasser-Extrakt (1 : 20). Extraktionszeit 4 Std.
Emulsion: Lecithinöl-Emulsion.
Zeit: 24 Std.

	$\frac{n}{10}$ L.	Wasserzusatz	Verd. W.
10 ccm Emuls. + 9 ccm Ferment	31,1	29,7	5,7
10 ccm „ + 5 ccm „ + 10 ccm Glyc.	18,35	17,65	3,4
10 ccm „ + 5 ccm „ + 20 „ „	17,6	17,3	2,8
10 ccm „ + 5 ccm „ + 30 „ „	16,5	16,5	1,5
10 ccm „ + 5 ccm „ + 40 „ „	16,1	15,7	0,3
10 ccm „	0,35	0,5	
9 ccm Ferment	24,0	23,7	
25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol	0,15	0,25	
10 ccm Glycerin + Aether-Alkohol	0,65	0,65	
20 ccm „ + „ „	1,15	1,15	
30 ccm „ + „ „	1,7	1,7	
40 ccm „ + „ „	2,1	2,1	

II.

Ferment: C_2. 24 Std. Wasser-Extrakt (1 : 10). Chloroformzusatz.
Zeit: 24 Std.

	$\frac{n}{10}$ L.	Wasserzusatz	Verd. W.
10 ccm Emuls. + 9 ccm Ferment	15,0	„	0,8
10 ccm „ + 9 ccm „ + 10 ccm Glyc.	13,9	„	0
10 ccm „ + 9 ccm „ + 30 ccm „	13,9	„	0
10 ccm „ + 9 ccm „ + 30 ccm „	14,0	„	0
10 ccm „ + 9 ccm „ + 40 ccm „	14,1	„	0
10 ccm „	0,4	0,4	
9 ccm Ferment sofort	13,0	13,0	
9 ccm „ 24 Std.	13,95	13,95	
10 ccm Glycerin + Aether-Alkohol	0,5	0,5	
20 ccm „ + „ „	0,75	0,75	
40 ccm „ + „ „	1,4	1,4	

III.

Ferment: Pankreatin Rhenania. Wasser-Extrakt (1 : 20). Extraktionszeit 4 Std.
Emulsion: Lecithinöl-Emulsion.
Zeit: 24 Std.

	$\frac{n}{10}$ L.	Wasserzusatz	Verd. W.
10 ccm Emuls. + 9 ccm Ferment	18,8	18,8	0
10 ccm „ + 9 ccm „ + 10 ccm Glyc.	17,9	17,9	0,9
10 ccm „ + 9 ccm „ + 20 ccm „	16,6	16,6	0
10 ccm „ + 9 ccm „ + 30 ccm „	16,8	16,8	0
10 ccm „	0,45	0,55	

Wasser	Oel	Ferment	Glycerin	$\frac{n}{10}$ L.	Wasserzusatz	Verd. W.
10 ccm	+ 1 ccm	+ 9 ccm		21,8	21,0	1,9
10 ccm	+ 1 ccm	+ 9 ccm	+ 10 ccm	18,2	17,6	0,5
10 ccm	+ 1 ccm	+ 9 ccm	+ 20 ccm	16,2	16,2	0
10 ccm	+ 1 ccm	+ 9 ccm	+ 30 ccm	16,2	16,2	0
9 ccm	Ferment			19,5	18,9	
9 ccm	„	+ 10 ccm	Glycerin	16,9	16,9	
9 ccm	„	+ 20 ccm	„	16,5	16,5	
9 ccm	„	+ 30 ccm	„	17,0	17,0	

Die Titrationen bei 20 bezw. 30 ccm Glycerinzusatz sind ungenau, weil keine Mischung mehr bestand.

Anmerkung. Um die Umrechnung wegen des Glycerinzusatzes zu vermeiden und um durch den möglicherweise bestehenden Einfluss des Glycerinzusatzes auf das Trypsin nicht gestört zu werden, wurden als Kontrollproben die Fermentlösungen mit dem Zusatz von 10, 20, 30 ccm Glycerin ebenfalls im Brutschrank aufgehoben, und diese Werte von den Werten aus den Verdauungsflüssigkeiten in Abzug gebracht. Die Titrationen der stark glycerinhaltigen Lösungen sind ungenau und schwierig anzustellen, weil, namentlich nach dem Wasserzusatz, keine Entmischung eintritt.

Das Resultat, das aus diesen Versuchen wieder zu entnehmen ist, wäre, dass eine Hemmung der Fermentwirkung durch Glycerin eintritt.

Theoretisch hat der Befund Interesse, weil das Glycerin ja das eine der auftretenden Spaltungsprodukte ist, und die Hemmung der Fermentwirkung mit dem Einflusse der Spaltungsprodukte auch von anderen Fermentreaktionen bekannt ist. (Oppenheimer, II. Aufl. p. 54.)

IV. Wie erhält man ein möglichst wirksames Steapsin aus dem Pankreas?

Stellt man Fermentlösungen aus Pankreasdrüsen dar, dann erhält man natürlich stets ein Gemenge der in der Pankreasdrüse enthaltenen verschiedenen Fermente.

Im allgemeinen ist es leicht, — das geht aus allen Literaturangaben immer wieder hervor, — die tryptische und diastatische Wirkung an den Drüsen-Extrakten nachzuweisen; dagegen ist das Steapsin allen möglichen Einflüssen gegenüber ungemein empfindlich.

Für die Gewinnung eines steapsinhaltigen Pankreasauszuges schlug Grützner folgendes Verfahren ein: Vollkommen

frisches Pankreas wird in einem Mörser mit Glaspulver zerrieben und mit einer Lösung gemischt, die aus 90 ccm Glycerin und 10 ccm 1%iger Na_2Co_3lösung zusammengesetzt ist. Die Mischung geschieht im Verhältnis von 30 ccm Glycerinlösung auf 3 g Pankreas. Länger als 4—5 Tage darf das Gemisch nicht stehen, da es nach dieser Zeit trotz des Alkalizusatzes sauer wird. Die Säure zerstört dann das Steapsin.

Kühne verwendete dagegen Rindspankreas, das 24 Std. an der Luft gelegen hat. Dasselbe wird freigemacht von Fett und Bindegewebe, mit Alkohol absolut. zerrieben, nach kurzem Stehen filtriert und abgepresst, mit Aether verrieben und nochmals filtriert, wieder abgepresst und durch Abdunstenlassen des Aethers an der Luft getrocknet. Die Trockensubstanz wird abermals zerrieben und durch Drahtgaze gesiebt. Nur das durchfallende Pulver gelangt zur Verwendung. Statt das Pulver als solches zu gebrauchen, kann man es mit 2½%igem Chloroformwasser unter Zusatz einiger Tropfen Natriumkarbonatlösung einen Tag bei 40° digerieren und das Filtrat zu Versuchszwecken verwenden. Weiter kann man das Trockenpulver extrahieren, indem man 1 Teil des Pulvers mit 5—10 Teilen einer 1‰igen Salicylsäurelösung bei 30° 3—4 Std. lang digeriert, koliert und filtriert.

Die Mehrzahl der übrigen Autoren, die sich mit der Extraktion der Pankreasfermente aus der Drüsensubstanz beschäftigt haben, können eigentlich nur konstatieren, dass das Steapsin nach ihren Methoden nicht zu erhalten ist; diese Methoden sind also nur für Herstellung des tryptischen bezw. diastatischen Fermentes zu empfehlen.

So gibt Neumeister über die Gewinnung der Pankreasenzyme folgendes Verfahren an: Die Enzyme lassen sich aus der Drüse eines geschlachteten Tieres, zweckmässig lässt man die Drüse einen Tag bei Zimmertemperatur liegen, durch mehrtägiges Digerieren im Brutschrank mittels Glycerin, Salicylsäure oder Chloroformwasser ausziehen. In der Regel enthalten diese Extrakte nur Trypsin, Ptyalin, Lab, während die Wirkung des Steapsins wegen seiner äusserst grossen Empfindlichkeit vermisst wird.

Roberts extrahierte das Organ mit einer Lösung, die 3 oder 4 Prozent einer Mischung von 2 Teilen Borsäure und einem Teil Borax enthält; das Steapsin ist in dem Extrakt nicht nachzuweisen.

Harris und Gow zerkleinerten frisches Pankreas und

brachten es in gesättigte NaCl-Lösung. Die Pankreasenzyme werden hierdurch gelöst; die Lösungen sind bezüglich der anderen Fermente kräftig wirksam, nur die Steapsinwirkung wird vermisst.

Auch Danilewsky erhält nach seiner Methode keine Steapsinwirkung. Einem wässerigen Pankreasinfuse, das mit Magnesiumkarbonat behandelt war, wird Kollodium zugesetzt. Dieses fällt die Eiweisskörper und das proteolytische Ferment in gelatinöser Form. Das Filtrat des Niederschlags wird im Vakuum konzentriert, mit starkem Alkohol behandelt, der einen flockigen Niederschlag fällt. Dieser wird in Mischung gleicher Teile von Alkohol und Wasser digeriert. Die Flüssigkeit wird dialysiert, im Vakuum konzentriert und durch absoluten Alkohol gefällt. Der gefällte Körper hat in hohem Masse diastatische Wirksamkeit. Steapsin fehlt. Angeblich wird es durch das Magnesiumkarbonat zerstört.

Schliesslich ist noch anzuführen Heidenhains Methode: Das Pankreas eines Hundes, der 18—20 Std. nach reichlicher Mahlzeit getötet wurde, wird entfernt, gewogen, im Mörser zerrieben; die zerkleinerte Masse bleibt 24 Std. stehen bei Zimmertemperatur und wird dann mit 1 ccm Essigsäure (1% ige) auf jedes Gramm gemischt. Auf je ein Gewichtsteil der saueren Mischung werden 10 Gewichtsteile Glycerin zugefügt. Nach 3 Tagen kann der unlösliche Rückstand von der Glycerinlösung abfiltriert werden. Dieses Verfahren liefert aber nur das tryptische Ferment; das Steapsin ist wiederum zerstört.

Bouchardat und Sandras behandelten Pankreasinfuse mit Wasser und fällten die Lösungen mit Alkohol. Der Niederschlag war in Wasser löslich; sie nannten ihn Pankreatin. Das Pankreatin ist eine Mischung mehrerer Pankreasenzyme, zeichnet sich aber namentlich durch eine sehr kräftige diastatische Wirkung aus.

Einen ähnlichen Erfolg erzielte v. Wittich mit seiner Methode: Ein zerteiltes Pankreas wird entwässert dadurch, dass es zuerst in starken Alkohol, dann in absoluten Alkohol gebracht wird, dessen Einwirkung es einige Zeit ausgesetzt sein muss. Die getrocknete feste Masse wird vom Alkohol getrennt und in Glycerin maceriert. Die Glycerinlösung wird mit Alkohol gefällt und der Niederschlag bei niedriger Temperatur getrocknet. Er ist in destilliertem Wasser teilweise löslich. Der so gewonnene Körper zeichnet sich nur durch grosse diastatische Kraft aus.

Aus vorstehend angeführten Literatur-Angaben erhellt, dass das Steapsin ungemein empfindlich ist und die Darstellung einer brauchbaren steapsinhaltigen Lösung mit grossen Schwierigkeiten verknüpft ist.

Für die Gewinnung des Steapsins eignen sich nur die Methoden von Grützner und von Kühne; allein auch diese beiden Autoren widersprechen sich und zwar in sehr wesentlichen Punkten. So fordert Grützner ganz frisches Drüsenmaterial, Kühne dagegen verarbeitet solches Pankreas, das 24 Std. an der Luft gelegen hat. Grützner hält Säuren inbezug auf das Steapsin ausdrücklich für schädlich; Kühne dagegen extrahiert sogar mit dünner Salicylsäurelösung.

Auch Claude Bernard behauptet, dass das Pankreas nur solange die Fette zu spalten vermag, als es frisch ist. Bidder und Schmidt wiesen darauf hin, dass die fettspaltende Fähigkeit des Pankreas durch die Gegenwart von Säuren aufgehoben wird. Dies hat auch Grützner besonders betont. Es hat ihn dazu bewogen, nur frische Drüsen, d. h. Drüsen, die nicht sauer sind, zu verarbeiten und die Extraktion mit Glycerin nicht allzulange auszudehnen[1].) —

Nach all dem schien es für die Aufklärung über die Gewinnung eines möglichst kräftigen Steapsins erforderlich zu sein, einmal Versuche darüber anzustellen, in welcher Weise die Drüsensubstanz am besten zu behandeln ist.

Ich habe daher experimentell geprüft, ob frische Drüsen oder solche, die 24 Std. an der Luft gelegen haben, die wirksamsten Extrakte liefern; weiter habe ich untersucht, ob es am zweckmässigsten ist, die Drüsensubstanz mit Glycerin zu extrahieren oder auf Trockenpulver zu verarbeiten, und wie letztere endlich am besten zu extrahieren sind; dabei musste ich mich bei der Langwierigkeit der Versuche zunächst auf einige einfache Extraktionsmittel beschränken.

Art der Aufarbeitung der Pankreasdrüsen.

Zu meinen Versuchen verwendete ich gewöhnlich 10 Rinderpankreasdrüsen. Ich erhielt diese gewöhnlich 4—6 Std. nachdem das

[1]) In seiner Dissertation erwähnt Engel (S. 6), dass er anfangs die beste Extraktionsmethode festzustellen versucht hat; er hat aber bei einer ganzen Reihe von Fällen Misserfolge gehabt; er scheint ein positives Resultat nur in einem Falle erzielt zu haben. Deshalb hat er späterhin das von den Rhenaniawerken in den Handel gebrachte Pankreatin für seine Versuche ausschliesslich benutzt.

Tier getötet war und präparierte sie frei von Fett und Bindegewebe. Alsdann wurde das Material mit dem Messer grob zerkleinert, hierauf zweimal durch die Fleischmaschine gedreht, bis es in eine breiartige Masse verwandelt war. Der Drüsenbrei wurde in 2 gleiche Hälften abgewogen. Eine Hälfte wurde sofort verarbeitet, die andere 24 Std. später; während dieser Zeit stand sie im Kühlschrank.

Von der ersten Hälfte Drüsenbrei wurde eine bestimmte Gewichtsmenge abgewogen und mit Glycerin versetzt, in dem Verhältnis, dass auf 1 g Drüsenbrei 2 ccm Glycerin kamen. Nach längerem Umrühren wurde der Glycerinaufguss bei 37° in den Brutschrank gestellt und von Zeit zu Zeit wiederum gut durchgerührt. Nach Ablauf von 2×24 Std. wurde der Glycerinaufguss koliert; der auf dem Koliertuch bleibende Brei wurde mit der Presse kräftig ausgepresst. Der so erhaltene Glycerinauszug wurde vor seiner Verwendung in kleineren Portionen bei Bruttemperatur durch Filtrierpapier filtriert. Genau in der gleichen Weise wurde am folgenden Tage ein abgewogener Teil der 2. Hälfte (die 24 Std. an der Luft gestanden hatte) behandelt.

Diese Glycerinextrakte der rohen Drüsensubstanz werden im folgenden als „direkte Glycerinextrakte" bezeichnet und mit dem Index I bezw. III versehen, je nachdem sie aus frischem oder 24stündigem Drüsenmaterial genommen sind.

Der Rest der ersten Hälfte wurde ebenfalls gewogen und dann in einem Glase mit einer grösseren Menge 90%igen Alkohols übergossen. Unter tüchtigem, öfterem Umrühren wurde der Alkohol täglich 2mal gewechselt. Nach 6–7 Tagen wurde der Alkohol durch Aether ersetzt. Unter Aether blieb das Material 2 Tage, wobei der Aether ebenfalls täglich 2mal unter gutem Umrühren gewechselt wurde. Nun wurde der Aether abfiltriert und das Drüsenmaterial in die Sonne zum Trocknen aufgestellt. Das so erhaltene Trockenpulver wurde auf einer möglichst fein gestellten Kaffeemühle gemahlen und gewogen.

Die gleiche Behandlung erfuhr vom nächsten Tage ab der Rest der anderen Hälfte. Die Trockenpulver führen späterhin durchweg den Index II (frische Drüsenmasse) bezw. IV (24stündiges Material).

Schon äusserlich sind Unterschiede wahrzunehmen zwischen Glycerinauszug und Trockenpulver der frischen Drüsen einerseits und Glycerinauszug und Trockenpulver der 24stündigen Drüsen andererseits. Die Glycerinauszüge aus frischen Drüsen sind dunkler, relativ dünnflüssig, lassen sich ziemlich gut kolieren und filtrieren. Die Auszüge der 24stündigen Drüsen sind heller, relativ dickflüssig, lassen sich schlecht kolieren und filtrieren; ausserhalb des Brutschrankes filtrieren sie fast gar nicht, im Brutschrank nur äusserst langsam. Auch durch Zentrifugieren auf einer Zentrifuge von hoher (3000) Tourenzahl liessen sich die Glycerinauszüge nicht klären; es setzten sich nur wenige der suspendierten Gewebsteilchen an der Oberfläche der Masse ab, der grössere Teil blieb aber in der Flüssigkeit suspendiert. —

Das Trockenpulver aus frischen Drüsen ist hell, gut trocken und lässt sich gut mahlen; das aus den 24stündigen Drüsen jedoch ist dunkler, relativ feucht und lässt sich nur schwer mahlen. Eine Gewichtsmenge frischer Drüsen liefert mehr Trockenpulver als eine gleiche Gewichtsmenge 24stündiger Drüsen. Diese Trockenpulver wurden nicht in Substanz angewendet, sondern in Form von Extrakten; die Extrakte wurden hergestellt mit Glycerin und Wasser bei Brut-

ofentemperatur. Mit Glycerin wurde 24 Std. lang bei Brutschrankwärme extrahiert, mit Wasser erstens nur 4 Std. lang, zweitens während 24 Std.; selbstredend war es nötig bei den länger dauernden Wasser-Extraktionen ein Desinficiens zuzusetzen. Als solches diente Chloroform, und zwar 20 Tropfen. Die aus Trockenpulvern bereiteten Extrakte führen, soweit sie mit Wasser extrahiert sind, die Bezeichnung Wasser- oder Chloroformwasserextrakt mit dem bezüglichen Index des Trockenpulvers. Die Glycerinextrakte aus Trockenpulvern bezeichne ich zum Unterschiede von den Glycerinextrakten aus rohem Drüsenmaterial (direkte Glycerinextrakte) als „indirekte Glycerinextrakte" und füge hinzu den jeweiligen Index des Trockenpulvers. —

Die Methode, welche zur Bestimmung der Acidität im Verlaufe der Verdauungsversuche angewendet wurde, ist dieselbe, wie ich sie in dem ersten Abschnitt bei den Mengen- und Zeitversuchen beschrieben habe; nur kommt hinzu, dass später nach der vorgängigen Titration 30, 40 oder 60 ccm Wasser zugesetzt wurden und event. durch Zurücktitrieren mit Säuren resp. Zusatz von $\frac{n}{10}$ Schwefelsäure und nochmaliges Titrieren die Acidität bestimmt wurde.

Ich teile zunächst die Versuchsergebnisse von 3 derartigen Pankreasaufarbeitungen mit.

Pankreasaufarbeitung A.

10 Rinderpankreasdrüsen aus dem Schlachthaus bezogen am 25. VI.

Pankreaspräparate.

AI. Direktes Glycerinextrakt 300 g fr. P.: 600 ccm Glycerin
AIII. „ „ 300 g 24 std. P.: 600 ccm „

AII. Trockenpulver 250 g fr. P. = 57,5 Trockenp.
AIV. „ 250 g 24 std. P. = 39,5 „

Die Trockenpulver sind im allgemeinen, ausgenommen im 1. Versuch, wo die Extraktion stattgehabt hat, im Verhältnis von 1 g Trockenpulver zu 20 ccm Flüssigkeit, stets ausgezogen nach dem Verhältnis von 1 : 10. Abgesehen vom 1. Versuch entspricht bei sämtlichen Extrakten, die zu AI, AIII, AII gehören:

1 ccm Extrakt = ½ g Roh-Pank.

Bei den zu AIV gehörenden Extrakten jedoch entspricht:

0,8 ccm Extrakt = ½ g Roh-Pank.

Zu Pankreasaufarbeitung A gehörige Versuche.

1.

Zeit: 24 Std.

Direkte Glycerinextrakte: 1 ccm = ½ g rohem P.

AI.	10 ccm Emulsion + 4 ccm Ferment	13,7	2,3
	4 ccm Ferment	11,1	
	4 ccm „ sofort	10,45	
AIII.	10 ccm Emulsion + 4 ccm Ferment	16,45	2,4
	4 ccm Ferment	13,8	
	4 ccm „ sofort	12,75	

Trockenpulver. In diesem Versuche sind sie extrahiert im Verhältnis von 1 : 20.

Extrakte AII. 2 ccm = ½ g rohem P.
Extrakte AIV. 1,6 ccm = ½ g „ „

Indirekte Glycerinextrakte.

AII.	10 ccm Emulsion + 4 ccm Ferment	2,65	0,9
	4 ccm Ferment	1,45	
	4 ccm „ sofort	0,95	
AIV.	10 ccm Emulsion + 4 ccm Ferment	5,4	0,4
	2 ccm Ferment	2,45	
	(4 ccm Ferment	4,7)	
	2 ccm Ferment sofort	1,8	

Wasserextrakte. 4 Std. Extraktionszeit.

AII.	10 ccm Emulsion + 8 ccm Ferment	23,95	0,75
	8 ccm Ferment	22,9	
AIV.	10 ccm Emulsion + 8 ccm Ferment	16,1	1,15
	8 ccm Ferment	14,65	
	10 ccm Emulsion sofort	0,45	
	10 ccm „ 24 Std.	9,6?	

für Emulsion ist also abzuziehen: 0,3.

2.

Zeit: 24 Std.

Direkte Glycerinextrakte. 1 ccm Extrakt = ½ g rohem P.

AI.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	28,5	3,0
	8 ccm „	25,3	
AIII.	10 ccm Emulsion + 2,5 ccm „	10,6	3,75 i. e. 13,5 für 9 ccm
	2,5 ccm „	6,65	

Trockenpulver. In diesem Versuche sind sie extrahiert im Verhältnis von 1 : 10.

Extrakte AII. 1 ccm = ½ g rohem P.
„ AIV. 0,8 ccm = ½ g „ „

Indirekte Glycerinextrakte.

AII.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	7,6	1,8
	+ 9 ccm „	5,6	
AIV.	10 ccm Emulsion + 7,9 ccm „	18,9	4,15
	+ 7,2 ccm „	14,55	

Wasserextrakte. 4 Std. Extraktionszeit.

AII.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	31,75	1,55
	+ 9 ccm „	30,00	
AIV.	10 ccm Emulsion + 7,2 ccm „	31,2	0,7
	+ 7,2 ccm „	30,3	

Wasserextrakte. 24 Std. Extraktionszeit; Chloroformzusatz.

AII.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	33,9	5,05
	+ 9 ccm „	28,65	
AIV.	10 ccm Emulsion + 7,2 ccm „	27,7	9,6
	+ 7,2 ccm „	17,9	
	10 ccm Emulsion	0,35	
	25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol	1,15	

Bei Berechnung der Werte kommt 0,2 in Abzug.

Anmerkung. Das Glycerinextrakt aus dem Pankreas, das 24 Std. alt war, filtrierte sehr schlecht, sodass nur $2^1/_2$ ccm Fermentlösung für den Versuch zur Verfügung standen.

Es wurde daher der Versuch gemacht, nach Verdünnung auf die Hälfte mit Wasser und Vermischen mit Kieselguhr eine filtrierbare Lösung zu gewinnen. Das gelang auch insofern als die Lösung sich ausgezeichnet mit der Wasserstrahlpumpe durch eine hindurchsaugen liess und ein klares Filtrat ergab.

Allein durch diese Manipulation war dem Extrakt die fettspaltende Wirkung abhanden gekommen, während das tryptische und diastatische Ferment sehr gut wirksam blieben. (cf. B, 2.)

10 ccm Emulsion + 18 ccm Kieselguhrfiltrat		32,55
+ 18 ccm „		32,60
10 ccm Emulsion + 5 ccm „		10,6
+ 5 ccm „		10,65

in 10 Minuten ist Stärkekleister gespalten,
in 20 „ „ eine Fibrinflocke fast gelöst,
nach $3^1/_2$ Stunden ist die Fibrinflocke vollständig gelöst.

Pankreasaufarbeitung B.

Die Rinderpankreasdrüsen sind aus dem Schlachthaus am 10. VII. bezogen.

Pankreaspräparate.

BI.	Direktes Glycerinextrakt	400 g	fr. P.: 800 ccm	Glycerin
BIII.	„ „	164 g	24 std. P.: 328 ccm	„
BII.	Trockenpulver	400 g	fr. P. = 128 g	Trockenp.
BIV.	„	300 g	24 std. P. = 34 g	„

Die Trockenpulver wurden extrahiert im Verhältnis von 1 g Pulver zu 10 ccm Flüssigkeit. Es entspricht bei den zu BI und BIII gehörigen Extrakten 1 ccm = $^1/_2$ g Roh-Pankreas; bei den Extrakten aus BII und BIV entspricht bezüglich 1,6 ccm = $^1/_2$ g Roh-Pankreas.
0,56 ccm = $^1/_2$ g „ „

Zu Pankreasaufbereitung B gehörende Versuche.

1.

Der Versuch wird gemacht 3 Tage nach dem Ansetzen des Pankreasbreies mit Glycerin.

Zeit: 24 Std.

Direkte Glycerinextrakte.

BI.	10 ccm Emulsion + 10 ccm Ferment	30,05	6,5 für 9 ccm
	8 ccm „	18,9	
	10 ccm Emulsion	0,4	
	25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol	0,2	

Wirkung von 10 ccm Ferment beträgt also:

$30{,}05 - \frac{10}{8} \cdot 18{,}9 - (0{,}4 - 0{,}2) =$ 7,25

Wirkung für 9 ccm also = 6,50

B III.	10 ccm Emulsion + 8 ccm Ferment	30,7	13,6 für 9 ccm
	2 ccm	4,75	

Wirkung von 8 ccm Ferment beträgt also:

$30{,}7 - 4 \cdot 4{,}55 - 0{,}4 =$ 12,1

Wirkung von 9 ccm Ferment also = 13,6

1 a.

Dasselbe 24 Std. Pankreas von B (siehe Versuch III in der Einleitung) wurde auch mit Wasser extrahiert: 136 g 24 St.. Pankreas wurden mit 180 ccm Wasser 4 Std im Brutschrank extrahiert; also 0,7 ccm Extrakt = ½ g Roh-Pankreas.

In die Erlenmeyerkölbchen wurde für den Versuch ein Chloroformzusatz gemacht.

Zeit: 24 Std.

10 ccm Emulsion + 6,3 Ferment	66,7	6,3
10 ccm Ferment	95,4	
10 ccm Emulsion	0,4	
10 ccm Ferment sofort	50,4	

Wegen der starken Veränderung der Fermentlösung selbst (trotz des Chloroformzusatzes war Fäulnis da) und wegen des hohen Säurewertes der Fermentlösung, die bei der Berechnung grosse Fehler hineinbringen kann und die Titrierung an sich erschwert, ist die Wasser-Extraktion von Roh-Pankreas also nicht zu empfehlen.

2.

Der Versuch wird gemacht am 25. VII., es werden sämtliche B-präparate geprüft. Der Versuch läuft gleichzeitig mit Versuch 2 der Pankreasaufarbeitung A.

Zeit: 24 St.

Direkte Glycerinextrakte.	1 ccm Extrakt = ½ g Roh-P.		
BI.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment	30,9	4,0
	9 ccm „	26,7	
BIII.	10 ccm Emulsion + 9 ccm „	34,7	2,5
	9 ccm „	32,0	

Trockenpulver. In diesem Versuche sind sie extrahiert im Verhältnis von 1 : 10.

Extrakte BII. 1,6 ccm = ½ g Roh-P.
„ BIV. 0,56 ccm = ½ g „

Indirekte Glycerinextrakte.

BII.	10 ccm Emulsion + 14,4 ccm Ferment	5,3	0,6
	14,4 ccm „	4,5	
BIV.	10 ccm Emulsion + 5,1 ccm „	10,8	1,3
	5,1 ccm „	9,3	

Wasserextrakte. 4 Std. Extraktionszeit.

BII.	10 ccm Emulsion + 14,4 ccm Ferment	19,75	0,45
	14,4 ccm „	19,1	
BIV.	10 ccm Emulsion + 5,1 ccm „	20,5	6,1
	5,1 ccm „	14,2	

Wasserextrakte. 24 Std. Extraktionszeit; Chloroformzusatz.

BII.	10 ccm Emulsion + 14,4 ccm Ferment	23,8	—
	14,4 ccm „	23,7	
BIV.	10 ccm Emulsion + 5,1 ccm „	23,5	2,7
	5,1 ccm „	20,6	
	10 ccm Emulsion nach 24 Std.	0,35	
	25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol	0,15	

Bei der Berechnung sind also 0,2 in Abzug zu bringen.

Anmerkung 1. Gelegentlich der Aufarbeitung B ist der Versuch gemacht worden, die Alkoholbehandlung bei der Herstellung der Trockenpulver abzukürzen; sie dauerte hier nur 4 Tage bei täglich zweimaligem Wechsel des Alkohols. Diese Zeit genügte aber nicht zur gründlichen Entwässerung des Pankreasbreies. Daher kam es auch, dass nach der Aetherbehandlung und dem Verjagen dieses die Trockenpulver noch sehr feucht waren. Dies hatte den weiteren Uebelstand zur Folge, dass sich die Trockenpräparate in der Kaffeemühle nicht mahlen liessen; so mussten dann für diesen Versuch die Präparate in dem groben, nicht pulverisierten Zustand verwandt werden.

Anmerkung 2. Mit dem Glycerinextrakte BI wurde der Versuch gemacht, eine leichter filtrierbare Lösung durch Behandeln mit Kieselguhr zu gewinnen, allerdings mit dem gleichen Erfolge wie bei AIII. Das fettspaltende Ferment war verschwunden, die tryptische und diastatische Wirkung hingegen erhalten.

Zeit: 24 Std.

10 ccm Emulsion + 18 ccm Kieselguhrfiltrat	29,2
18 ccm „	29,2

In 20 Minuten war eine grosse Fibrinflocke durch (5 ccm Filtrat + 5 ccm Na_2CO_3lösung 1%ige) beinahe gelöst; Stärkekleister war innerhalb dieser Zeit gespalten.

Pankreasaufarbeitung C.

Die Pankreasdrüsen sind aus dem Schlachthaus am 30. VII. bezogen.

Pankreaspräparate.

CI.	Direktes Glycerinextrakt	200 g	fr. P.: 400 ccm Glycerin
CIII.	„ „	200 g 24 std.	P.: 400 ccm „
CII.	Trockenpulver	250 g	fr. P. = 51 g Trockenp.
CIV.	„	250 g 24 std.	P. = 32,5 g „

Die Trockenpulver wurden extrahiert im Verhältnis von 1 g Trockenpulver zu 10 ccm Flüssigkeit. Bei den Extrakten von CI, CIII, CII entspricht

1 ccm Extrakt = ½ g Roh-Pankreas,

für die Extrakte von CIV berechnet sich für

0,7 ccm Extrakt = ½ g Roh-Pankreas.

Zur Pankreasbearbeitung C gehörende Versuche.

1.

Der Versuch ist angesetzt am 7. VIII.

In dieser Versuchsreihe ist ausser Lecithin-Oel-Emulsion verwendet: 10 H_2O + 1 ccm Oel. Die Werte der zweiten Kolumne geben die Titrationswerte nach Zusatz von 30–40 ccm Wasser an. In der 3. Kolumne stehen die berechneten Zahlen, welche die Menge der abgespaltenen Säuren angeben.

Zeit: 24 Std.

Direkte Glycerinextrakte. 1 ccm Extrakt = ½ g Roh-P.

					Wassserzusatz	
CI.	10 ccm Emulsion	+ 9 ccm Ferm.	24,6	keine Aenderuug		4,0
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 9 ccm „	24,8	„	„	4,3
		9 ccm „	20,35	„	„	
CIII.	10 ccm Emulsion	+ 9 ccm „	33,8	„	„	6,5
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 9 ccm „	33,7	„	„	6,5
		9 ccm „	27,0	„	„	

Trockenpulver. Sie sind extrahiert im Verhältnis von 1 : 10.

Extrakte CII. 1 ccm = ½ g Roh-P.

„ CIV. 0,7 ccm = ½ g „

Indirekte Glycerinextrakte.

					Wasserzusatz	
CII.	10 ccm Emulsion	+ 4,5 ccm Ferm.	2,65	keine Aenderung		1,2
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 4,5 ccm „	2,6	„	„	1,2
		4,5 ccm „	1,8	„	„	
CIV.	10 ccm Emulsion	+ 6,5 ccm „	4,0	„	„	2,2
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 6,5 ccm „	3,95	„	„	2,3
		6,5 ccm „	2,6	„	„	

Wasserextrakte. 4 Std. Extraktionszeit.

CII.	10 ccm Emulsion	+ 9 ccm Ferment	13,9	13,7		3,1
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 9 ccm „	12,5	12,3		1,8
		9 ccm „	10,5	10,3		
CIV.	10 ccm Emulsion	+ 9 ccm „	24,8	23,6		5,2
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 3,5 ccm „	24,55	24,1		5,8

Wasserextrakt. 24 Std. Extraktionszeit; Chloroformzusatz.

CII.	10 ccm Emulsion	+ 9 ccm Ferment	19,9	19,9		6,0
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 9 ccm „	13,5	13,1		0,0
		9 ccm „	13,0	13,6		
CIV.	10 ccm Emulsion	+ 6,5 ccm „	22,5	21,4		0,0
	10 ccm H_2O — 1 ccm Oel	+ 6,5 ccm „	27,1	25,0		3,5
		6,5 ccm „	23,2	21,3		

10 ccm Emulsion	24 Std.	0,45
10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	24 „	0,35
25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol		0,15

Da bei vorstehendem Versuche bei den 24stündigen Wasserextrakten von beiden Pulvern offenbar ein Versuchsfehler untergelaufen ist, wurde dieser Teil des Versuchs in derselben Weise wie im Hauptversuch noch einmal wiederholt. Das Resultat folgt:

Wasserextrakt. 24 Std. Extraktionszeit; Chloroformzusatz.

CII.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment		15,0	15,0	0,8
	10 ccm „		0,4		
	9 ccm Ferment	sofort	13,0	13,0	
	9 ccm „	nach 24 Std.	13,95	13,95	
CIV.	10 ccm Emulsion + 6,5 ccm Ferment		27,4	26,9	5,8
	6,5 ccm Ferment	sofort	14,6	14,6	
	6,5 ccm „	nach 25 Std.	21,5	20,85	

Es wurden noch eine weitere Anzahl Versuche mit diesen beiden Pulvern bei passender Gelegenheit angestellt: stets zeigte das Resultat, dass CIV. weit wirksamer war als CII, z. B. (0,8 : 6,3; 0,7 : 3,6; 2,0 : 5,0) (die unterstrichenen Werte entsprechen: CIV.).

Anmerkung. Auch mit den Glycerinextrakten CI und CIII ist der Versuch gemacht worden, durch Kieselguhrbehandlung eine leichter filtrierbare Fermentlösung zu erhalten. Der Erfolg war wiederum derselbe wie in den früheren Versuchen: das Steapsin war nicht mehr wirksam, Trypsin und Diastase aber gut erhalten.

Zeit: 24 Std.

10 ccm Emulsion + 18 ccm Kieselguhrfiltrat	CI.	21,2
18 ccm „	CI.	21 3
10 ccm Emulsion + 13 ccm „	CIII.	24,8
13 ccm „	CIII.	24,5

Nach 10 Minuten ist Stärkekleister durch beide Kieselguhrfiltrate stark gespalten. Eine Fibrinflocke war in ca. 2 Stunden vollkommen gelöst.

Versuche mit Pankreatin Rhenania.

Zum Schluss gebe ich eine Uebersicht über die Wirksamkeit des fettspaltenden Fermentes von in hiesigen Apotheken zu verschiedener Zeit gekauften Präparaten von Pankreatin der Fabrik Rhenania-Aachen. Die Extrakte sind am Ende der Extraktionszeit filtriert worden.

1.

Der erste Versuch ist nach der anfangs geübten Methode angestellt. Es wurden zwei in gleicher Weise angesetzte Proben, eine war 10 Minuten gekocht, die andere war ungekocht, im Brutschrank gehalten. Die Wirksamkeit wurde bestimmt als die Differenz der nach 24 Std. erhaltenen Aciditätswerte. — Die Extrakte sind ausgezogen im Verhältnis von 1 : 20.

Glycerinextrakt. 24 Std. Extraktionszeit.

10 ccm Emulsion + 2 ccm Ferment	Zeit 6 Std.	ungek.	2,0	0,3
		gek.	1,7	

Wasserextrakt. 2 Std. Extraktionszeit.

10 ccm Emulsion + 3 ccm Ferment	22 Std.	ungek.	6,7	2,0
		gek.	4,7	

Wasserextrakt. 24 Std. Extraktionszeit; Chloroformzusatz.

10 ccm Emulsion + 4 ccm Ferment	4 Std.	ungek.	10,0	1,3
		gek.	8,7	

Zum Vergleiche stelle ich daneben einen Versuch, der mit Extrakten aus einem von mir hergestellten Trockenpulver aus 24stünd. Pankreas — Pankreaspulver III — angestellt wurde.

Glycerinextrakt (1 : 20). Extraktionszeit 24 Std.

10 ccm Emulsion + 2 ccm Ferment	Zeit 6 Std.	ungek.	2,2	0,8
		gek.	1,4	

Wasserextrakt (1 : 20). Extraktionszeit 1 Std.

10 ccm Emulsion + 3 ccm Ferment	22 Std.	ungek.	4,8	0,8
		gek.	4,0	

Wasserextrakt (1 : 20). Extraktionszeit 24 Std.; Chloroformzusatz.

10 ccm Emulsion + 4 ccm Ferment	4 Std.	ungek.	6,6	6,0	1,5
		gek.	5,1	4,5	

Der zweite Versuch, mit einem anderen Pankreatinpräparate angestellt, liefert im wesentlichen gleiche Resultate. Das Glycerinextrakt filtrierte klar, aber sehr langsam, sodass in 8 Std. nur 2 bis 3 ccm Filtrat erhalten wurden. Ich habe nun das unfiltrierte Extrakt auf einer Zentrifuge 20 Minuten zentrifugiert. Dabei setzte sich der grösste Teil des Rückstandes ab. Die darüber stehende, mit der Pipette abgehobene Flüssigkeit blieb aber auch nach dem Filtrieren mit Hilfe der Saugpumpe noch leicht getrübt; es müssen also noch kleine Partikelchen von Pankreatin darin suspendiert gewesen sein, welche in diesem Falle wohl die gute Wirksamkeit des Glycerinextraktes veranlasst haben. Denn auch bei dem 3. Versuche mit Pankreatin, wo ein klares Filtrat des Glycerinextraktes verwendet werden konnte, ist der Glycerinextrakt hinsichtlich der Wirksamkeit der schlechteste von den dreien.

2.

Es wurde ein anderes Präparat des Pankreatins gebraucht; die Extrakte sind sämtlich extrahiert im Verhältnis von 1 : 20.

Zeit: 24 Std.

Glycerinextrakt. Extraktionszeit 24 Std.

			Wasserzusatz		
10 ccm Emulsion	+ 9 ccm	Ferment	10,3	10,3	2,6
10 ccm H2O + 1 ccm Oel	+ 9 ccm	„	12,2	12,2	4,4
	9 ccm	„	7,5	7,5	

Wasserextrakt. Extraktionszeit 4 Std.

			Wasserzusatz	
10 ccm Emulsion	+ 9 ccm Ferment	21,2	20,9	1,7
10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 9 ccm „	24,9	24,1	4,8
	9 ccm „	19,0	19,0	

Wasserextrakt. Extraktionszeit 24 Std. Chloroformzusatz.

10 ccm Emulsion	+ 9 ccm Ferment	19,6	18,8	1,2
10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 9 ccm „	20,5	20,2	1,5
	9 ccm „	20,8	20,6	
10 cc Emulsion		0,4	0,45	
10 ccm H_2O + 1 ccm Oel		0,45	0,6	
25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol		0,25	0,25	

Zum Vergleiche waren von den Trockenpulvern zu C. — 24std. Chloroformwasserauszüge — angesetzt.

			Wasserzusatz.		
C 2.	10 ccm Emulsion	+ 9 ccm Ferment	11,9	dass.	0,7
	10 ccm „	+ 4,5 ccm „	6,05	„	0,4
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 9 ccm „	12,4	„	1,1
		9 ccm „	10,95	„	
C 4.	10 ccm Emulsion	+ 6,5 ccm „	22,1	21,9	? 3,6 s. früher.
	10 ccm „	+ 4,5 ccm „	18,6	17,2	4,4
		6,5 ccm „	18,1	18,1	

3.

Beim dritten Pankreatinpräparate wurden Extrakte im Verhältnis 1 : 10 dargestellt. Diese filtrierten sehr schlecht, sodass die gewöhnliche Anzahl von 9 ccm nicht erzielt werden konnte.

Glycerinextrakt. 24 Std. Extraktionszeit.

			Wasserzusatz.	
10 ccm Emulsion	+ 3 ccm Ferment	2,5	8,2	0,4
10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	3 ccm „	2,4	2,5	0,0
	3 ccm „	2,0	2,2	

Wasserextrakt. 4 Std. Extraktionszeit.

10 ccm Emulsion	+ 4 ccm Ferment	22,8	22,4	7,2
10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 4 ccm „	18,8	17,6	2,5
	4 ccm „	14,9	14,9	

Wasserextrakt. 24 Std. Extraktionszeit. Chloroformzusatz.

10 ccm Emulsion	+ 8 ccm Ferment	38,0	36,4	0,9
10 ccm H_2O + 1 ccm Oel	+ 8 ccm „	37,2	35,1	0,0
	8 ccm „	35,2	35,2	

Kurze Zeit — 2—4 Std. — mit Wasser extrahiert, liefert das Pankreatin fermenthaltige Lösungen, welche ebenso gut bezw. besser wirksam sind, als die letzten von mir selbst hergestellten Trockenpräparate. Bei einer 4stündigen Wasserextraktion werden also die besten Präparate erhalten. Dass hier schon die kurze Zeit genügt, um das Ferment zu extrahieren, rührt vermutlich daher, dass Pan-

kreatin zu einem feinen Mehl vermahlen ist; es kann folglich von dem Wasser rascher ausgelaugt werden als die selbstgefertigten Präparate, die von mir lange nicht so fein gepulvert werden konnten. Bei länger dauernder Extraktion des Pankreatins werden sich dann noch weitere Substanzen lösen, die schädigenden Einfluss haben; vielleicht aber werden auch die in den Extrakten enthaltenen anderen Pankreasfermente z. T. das Steapsin vernichten. Es werden sich bei Bruttemperatur dieselben Prozesse rascher abspielen wie beim Stehen der Glycerinextrakte aus Rohpankreas.

Grützner ermittelte, dass Glycerinextrakte nicht haltbar seien, vielmehr im Laufe der Zeit die Fähigkeit, Fette zu spalten, verlieren. Dies veranlasste mich, meine alten Glycerinextrakte, die zum Teil noch vorhanden waren und bei denen sich bereits Konglomerate von Tyrosinkrystallen abgeschieden hatten, nochmals auf ihre Steapsinwirkung zu untersuchen. — Der Versuch wurde angestellt am 28. August; verwendet wurden die Glycerinextrakte AI, AIII (ca. 8 Wochen alt); BI (ca. 6 Wochen alt); CI, CIII (ca. 4 Wochen alt). —

	Zeit: 24 Std.		Wasserzusatz.		
AI.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment		26,6	25,9	2,2
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel + 9 ccm	„	27,5	25,0	1,3
	9 ccm	„	20,0	23,5	
AIII.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment		34,6	31,2	0,0
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel + 9 ccm	„	35,7	34,1	2,8
	9 ccm	„	31,5	31,1	
BI.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment		28,2	27,0	1,1
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel + 9 ccm	„	28,4	26,9	1,0
	9 ccm	„	25,7	25,7	
CI.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment		24,9	24,9	5,0
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel + 9 ccm	„	25,4	25,4	5,5
	9 ccm	„	19,7	29,7	
CIII.	10 ccm Emulsion + 9 ccm Ferment		33,1	33,1	3,05
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel + 9 ccm	„	33,7	33,5	3,45
	9 ccm	„	29,85	29,85	
	10 ccm Emulsion		0,35	2 Tr.	
	10 ccm H_2O + 1 ccm Oel		0,35	2 Tr.	

In der folgenden Tabelle sind die Zahlen aus dem letzten Versuche mit den entsprechenden Zahlen aus früheren Versuchen gegenübergestellt. Aus der Uebersicht geht hervor, dass zwar die Wirksamkeit der Glycerinextrakte allmählich abnimmt (AI, AIII, BI, CIII), dass sie aber auch nach 2 Mo-

naten noch sehr gut nachzuweisen ist (AI und AIII); vielleicht kann sogar nach kurzem Stehen eine Zunahme der Wirksamkeit erfolgen (CI, AIII).

Ob die allmähliche Abnahme der Wirkung mit der Selbstverdauung der Lösung durch das Trypsin zusammenhängt, ob vielleicht die gebildeten Aminosäuren stören, oder ob die geringe Säuerung, die nach und nach eintritt, als solche schuld an der Abnahme ist, sind Fragen, über die sich nur Vermutungen aufstellen lassen.

Tabelle.

	AI.	AIII.	B.I.	CI.	CIII.	
	25. VI		10. VII.	30. VII		
sofort	*) **5,2**	*) **5,4**	*) **6,5**			Lecithin-Oel-Emuls.
nach 8 Tagen	**3,0**	*) **3,5**	**4,0**	**4,0**	**6,5**	
				4,3	**6,5**	
am 28. VIII.	**2,2**	**0,0**	**1,1**	**5,0**	**3,1**	
dto.	**1,3**	**2,8**	**1,0**	**5,5**	**3,6**	Wasser und Oel

*) Anmerkung. Die Werte sind aus der Wirkung kleinerer Fermentmengen auf die übliche Menge von 9 ccm berechnet. —

Auch die Tröckenpulver verlieren durch das Lagern an Wirksamkeit, wie nachstehender Versuch lehrt: Von den Trockenpräparaten AII, AIV wird je ein Chloroformwasserauszug von 24 Std. gemacht, im Verhältnis 1 : 10.

Zeit: 24 Std.

			Wasserzusatz.		
AII.	10 ccm Emuls. + 9 ccm Ferm.		32,6	31,7	
	9 ccm „		29,1	28,4	**3,1 früher 5,1**
	9 ccm „	sofort	15,4	15,4	
AIV.	10 ccm Emuls. + 7,2 ccm Ferm.		26,1	24,9	
	7,2 ccm „		23,0	22,2	**3,7 früher 9,6**
	7,2 ccm „	sofort	14,5	14,5	

Zum Schlusse fassse ich in einer tabellarischen Uebersicht die Resultate, die sich bei den 3 Pankreasaufarbeitungen ergeben haben, zusammen (fr. = frisch).

Tabelle.

	A.				B.		C. Emulsion		C. Wasser	C. Oel
	fr.	24 std.	fr.	24 std.	fr.	24 std.	fr.	24 std.	fr.	24 std.
Glycerin-extrakte	2,3	2,4	3,0	(13,5)[2]	6,5[1]	13,6[1]	4,0	6,5	4,3	6,5
					4,0	2,5				
Trockenp. Wasser-extrakt (4 std.)	0,75	1,2	1,6	0,7	0,5	6,1	3,1	5,2	1,8	5,8
			3,1	1,9						
Wasser-extrakt (24 std.)			5,1	9,6	0	2,7	6,0 0,8	0,0 5,8	0,0	3,5
Glycerin-extrakte (24 std.)	0,9	0,4	1,8	4,2	0,6	1,3	1,2[3]	2,2	1,2[3]	2,3

Es ist also durchweg, auf die gleiche Menge Roh-Pankreas berechnet, in der Regel das Präparat aus Drüsen, die 24 Std. an der Luft gelegen haben, wirksamer als ein Präparat, das aus frischen Pankreasdrüsen hergestellt ist. Die direkten Glycerinextrakte haben im allgemeinen etwa die gleiche Wirkung wie gute Extrakte aus den Trockenpulvern. Die Trockenpräparate lassen sich besser mit Wasser extrahieren als mit Glycerin; für die eigenen Präparate war eine längere Extraktion besser; für das fein vermahlene Pankreatin dagegen liefert eine kürzer dauernde Wasser-Extraktion bessere Resultate.

Die Trockenpulver sind für die Hantierung bequemer und dann auch noch darum für Versuchszwecke vorzuziehen, weil man bei ihnen Glycerinzusatz vermeiden kann. Denn nach den Resultaten von Abschnitt III hemmt Glycerinzusatz die Fermentwirkung, und dies kann bei Versuchen, in denen man grössere Mengen von glycerinhaltigen Fermentlösungen verwendet, störend wirken (siehe Einlage).

Das „Pankreatin Rhenania" hat sich nach meinen Versuchen ebensogut oder besser wirksam erwiesen als meine eigenen

[1]) Berechnet aus 7,25 für 10 ccm Fermentlösung statt 9 ccm.
resp. „ 12,1 „ 8 ccm „ „ 9 ccm
[2]) „ „ 3,75 „ 2,5 ccm „ „ 9 ccm
[3]) „ „ 0,6 „ 4,5 ccm „ „ 9 ccm

Trockenpulver; ausserdem ist es relativ billig. Darum empfiehlt es sich also, für fernere Versuche das Pankreatin, das auch schon von Volhard und Engel benutzt wurde, zu verwenden. Es wäre 2—4 Std. für den Versuch mit Wasser auszulaugen und zwar am besten in nicht höheren Konzentrationen als 1 : 20, weil sonst die Filtration der Extrakte zu langsam vor sich geht.

V. Welches Substrat ist das beste?

Die bisher in der Literatur beschriebenen Versuchsanordnungen für die Erkennung und Bestimmung der fettspaltenden Wirkung lassen sich am besten nach 3 Gruppen ordnen; entweder wurde mit Indikatoren die Säurung unter dem Einfluss des Pankreas erkannt, oder es wurden durch Aetherextraktion die abgespaltenen Fettsäuren nachgewiesen; schliesslich wurden wasserlösliche Substanzen benutzt, bei denen man titrimetrisch die Säuerung feststellen konnte.

Bernard war der erste, der erkannte, dass in Emulsionen, die durch Mischung von frischem alkalischem Pankreassafte mit einem neutralen Fette hergestellt wurden, sich sehr rasch sauere Reaktion entwickelt, und dass auch Pankreasgewebe selbst, wenn es mit neutralen Fetten bei Körpertemperatur in Berührung gebracht wird, saure Reaktion hervorruft. Die Säuerung konnte er leicht demonstrieren, wenn er von vornherein die Mischung mit Lackmustinktur versetzte.

Zur Bestimmung der Steapsinwirkung benutzte Grützner folgende Methode: Die Emulsion, die er verwendete, bereitete er sich, indem er 10 Teile Mandelöl mit 5 Teilen Gummi arabicum und 35 Teilen Wasser mischte; dann stellte er eine neutrale Lakmuslösung her. (Die Lakmuslösung machte er jeden Tag frisch derart, dass er soviel Lakmusextrakt in destilliertem Wasser auflöste, bis die Flüssigkeit in Probiergläschen von 1,2 cm Durchmesser vor weissem Papier einen ungefähr veilchenblauen Ton hatte.) Zu mehreren Reagensgläschen wurden 10 ccm Lakmuslösung und 5 Tropfen der obigen Emulsion zugefügt. Von den zu prüfenden Glycerinextrakten wurden je steigende Quantitäten (z. B. 2, 4, 6, 8 usw. Tropfen) in die verschiedenen Reagensgläser gebracht. die dann sofort in ein Wasserbad von 37° C. getaucht wurden. Nach kurzer Zeit wurden alle Gläser zugleich untersucht und zwar wurde festgestellt, wie viele Tropfen Extrakt zur Rötung des Lakmus nötig waren; auf diese Weise lässt sich der

relative Fermentgehalt von verschiedenen Lösungen leicht bestimmen.

In die zweite Gruppe von Arbeiten gehört der Nachweis von Berthelot, dass sich aus durch Pankreas verdautem Schweineschmalz eine bei 61° schmelzende Fettsäure darstellen lässt.

Volhard und seine Mitarbeiter — Stade, Zinsser, Engel — benutzten für ihre Versuche eine Emulsion, die sie aus Eigelb herstellten. Indem sie den Eidotter mit Wasser, Bouillon oder Zuckerlösung quirlten, erhielten sie eine verdünnte Emulsion, die sich für die Verdauungsversuche insofern gut eignete, als sie von den fettspaltenden Fermenten des Magens (Volhard, Zinsser) und des Pankreas (Engel) leicht angegriffen wurde. Die Bestimmung der Wirkungsgrösse geschah in der Weise, dass das Verdauungsgemisch mit Aether extrahiert und im Extrakt der Säuregehalt durch Titration ermittelt wurde. Zu diesem Zwecke wurde das verdaute Gemenge mit Kaolin und Natr. sulfuric. sicc. 2×24 Std. lang getrocknet, dann mit Aether 24 Std. lang im Soxhlet extrahiert. In einem aliquoten Teil des Aether-Extraktes wurden mit Phenolphthaleïn als Indikator nach Zusatz von 50 ccm Alkohol mit $\frac{n}{10}$ NaOH die Säure titriert (I. Titration). Dann wurden darin weiter durch Kochen mit 50 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH unter Zusatz von Alkohol die noch vorhandenen Neutralfette verseift und die gebildeten Seifen durch 5—10 ccm normale HCl oder H_2SO_4 zerlegt. Durch Titration dieser Lösung konnte der Gehalt an Fett bestimmt werden, das durch das Ferment noch nicht zerlegt war (II. Titration).

Volhard berechnet dann regelmässig aus den beiden Werten das prozentische Verhältnis des verdauten Fettes zu dem ursprünglich vorhandenen. Diese Beziehung ist natürlich willkürlich gewählt; auch die Rücksicht auf die Lehren der physikalischen Chemie kann keinen einfachen Aufschluss über die heranzuziehenden Funktionen des umgesetzten Betrages geben, weil es sich um heterogene Gleichgewichte handelt und das Massenwirkungsgesetz direkt nicht anwendbar ist.

Endlich ist eine Untersuchungsmethode zu erwähnen, bei der wasserlösliche Substanzen verwendet wurden. Berthelot liess Pankreassaft auf Monobutyrin einwirken; er erhielt ausser

unzerlegtem Monobutyrin ein Gemisch von freiem Glycerin, Buttersäure und Seife.

Hanriot verwendete diese Methode für die quantitative Bestimmung der Wirkungsgrösse von fettspaltendem Ferment, die er leicht durch einfache Titration des in der verdauten wässerigen Lösung freigewordenen Buttersäure erhielt.

In ähnlicher Weise ist die Spaltung von Essigäther (Heritsch) und von Tribenzoin (Nencki) zur Erkennung der Wirkung verwendet worden.

Wie auch Connstein in seinem Referat über fermentative Fettspaltung hervorhebt, beweisen diese Versuche nicht viel über die Spaltung vom eigentlichen Fett; hinzu kommt noch, dass Monobutyrin ein sehr labiler Körper ist, der durch alle möglichen Einflüsse leicht zersetzt wird.

Aus Gründen der Bequemlichkeit und um überhaupt über eine grössere Anzahl von Einzelversuchen ausgedehnte Beobachtungsreihen anstellen zu können, veranlasste Herr Prof. Frank mich zu versuchen, ob durch passenden Zusatz von Alkohol und Aether eine gleichmässige Mischung der Verdauungsflüssigkeit erzielt werden könnte, welche direkt titrierbar wäre. Das ist gelungen; welche Kautelen bei der Titration zu beobachten sind, habe ich im ersten Teil der Arbeit an der Hand von Experimenten erörtert.

Es fehlte aber an Erfahrung, welches Substrat am besten für solche Fettverdauungsversuche zu verwenden wäre.

Im Anfang hatte ich mit wenigen Kubikzentimetern relativ schwacher Fermentlösungen gearbeitet und dabei, wie die folgende Zusammenstellung lehrt, völlige Unwirksamkeit derselben gegenüber Oel, das in Wasser suspendiert oder mit äusserst verdünnter Na_2CO_3-Lösung emulgirt war, festgestellt, während Milch starke Säuerung erfuhr.

Oel-Milchversuche mit schwachen Fermenten.

1 ccm Oel + 10 ccm Wasser	+ 1 ccm E1	ungek.	23 Std.	7,6	0
		gek.	„	7,7	
10 ccm Milch	+ 1 ccm E1	ungek.	„	5,5	5,5
		gek.	„	0	
1 ccm Oel + 10 ccm Wasser	+ 1 ccm E1	ungek.	4 Std.	7,2	0
		gek.	„	7,3	
10 ccm Milch	+ 1 ccm E1	ungek.	„	4,3	4,3
		gek.	„	0	

1 ccm Oel + 10 ccm Wasser + 1 ccm E2	ungek.	23 Std.	1,2	0
	gek.	„	1,2	
10 ccm Milch + 1 ccm E2	ungek.	„	5,3	5,3
	gek.	„	0	
1 ccm Oel + 10 ccm Wasser + 1 ccm E2	ungek.	15 Std.	1,1	0
	gek.	„	1,1	
10 ccm Milch + 1 ccm E2	ungek.	„	2,9	2,9
	gek.	„	0	
1 ccm Oel + 10 ccm Wasser + 1 ccm E3	ungek.	3¾ Std.	1,3	0
	gek.	„	1,25	
10 ccm Milch + 1 ccm E3	ungek.	„	2,0	2
	gek.	„	0	
10 ccm Seifen-Emulsion + 1 ccm E1	ungek.	4 Std.	1,0	0
	gek.	„	0,9	
10 ccm Seifen-Emulsion + 1 ccm E2	ungek.	16 Std.	neutral	0
	gek.	„	„	

Die Milch wurde vorher gekocht. Die Seifen-Emulsion war hergestellt: 1 ccm Oel: 10 ccm Na_2CO_3 (1%ig): 20 ccm H_2O.

E1 war ein Glycerinextrakt aus 24 std. Pankreas.

E2 „ „ „ „ Trockenpulver extrahiert im Verhältnis 1 : 10. Extraktionszeit 16 Std.

E3 war ein Glycerinextrakt aus demselben Trockenpulver extrahiert im Verhältnis 1 : 50. Extraktionszeit 40 Std.

Der Gedanke, dass die geringe Oberfläche bei den Versuchen mit reinem Oel und die Trennung des Ferments von seinem Substrat durch das eine Reaktionsprodukt die Seife schuld an der schlechten Wirkung war, gab Veranlassung Emulsionen aus Oel mit Lecithin als Emulgens herzustellen, auf die sich auch bei den schwachen Fermenten deutlicher Einfluss zeigte. Diese Emulsionsversuche lasse ich sofort folgen:

Lecithin-Oel-Emulsion (3 g ccm Lecithin Merck: 15 ccm Oel: 300 ccm H_2O).

10 ccm Emulsion + 1 ccm E1	ungek.	6 Std.	1,0	0,3
	gek.		0,7	
10 ccm Emulsion + 1 ccm E1	ungek.	24 Std.	1,2	0,2
	gek.		1,0	
10 ccm Emulsion + 1 ccm E2	ungek.	6 Std.	7,65	0,3
	gek.		7,3	
10 ccm Emulsion + 1 ccm E2	ungek.		7,55	0,25
	gek.		7,3	

Solche Emulsionen habe ich in einer grossen Reihe von Versuchen mit Erfolg angewendet.

Ich habe dann später in systematisch daraufhin angelegten Versuchen die Wirkung von Steapsin geprüft; diese

haben allerdings gezeigt, dass auch in der Seifenemulsion das Fett gespalten wird, und dass reines Oel zuweilen recht kräftig angegriffen wird, dass aber hierzu auch kräftige Fermente gehören.

In der Regel, allerdings nicht immer, zeigte sich auch in späteren Versuchen, dass die Lecithinemulsion, selbst wenn schwächere Ferment-Extrakte verwandt wurden, verdaut wurde.

In den Versuchsreihen wurde in den Oel-Präparationen gewöhnliches, nicht von Säuren befreites Olivenöl benutzt. Verwendet wurde für diese Uebersicht:

1. Seifen-Emulsion; diese bereitete ich, indem ich 1 ccm Oel mit 10 ccm einer $^1/_2$ %igen Natriumkarbonatlösung emugierte.

2. Lecithin-Oel-Emulsion; die Herstellung dieser ist in dem ersten Abschnitt angegeben. In der Regel wurde diese Stammemulsion nochmals auf das Dreifache verdünnt. In einzelnen Versuchen aber habe ich neben der verdünnten Emulsion die Stammemulsion als solche verwendet.

3. Lecithin-Emulsion; es wurden ohne Oelzusatz nur 3 g Lecithin mit 300 ccm Wasser emulgiert und diese Lösung teils aufs 3fache verdünnt, teils unverdünnt untersucht

4. Milch; die verwendete Milch wurde 1 Std. lang im Wasserbade gekocht und nach dem Erkalten filtriert. Wegen der Einwirkung des Trypsins auf die Eiweisskörper der Milch war ein zweiter Versuch nötig, der diese Wirkung zahlenmässig feststellte.

Dazu wurden von derselben vorher gekochten und filtrierten Milch 50 oder 100 ccm abgemessen und in einem Scheidetrichter mit Aether nach Zusatz von einigen Tropfen Natronlauge zweimal 10 Minuten lang geschüttelt; aus der so grösstenteils entfetteten Milch wurde bei 50° C. der Aether im Vacuum verjagt und die Lösung dann auf 100 bezw. 250 ccm mit Wasser aufgefüllt; für den Kontrollversuch wurde dann die 10 ccm der ursprünglichen Milch entsprechende Menge dieser Lösung verwendet.

Die Differenz zwischen den beiden Versuchen, dem mit nur gekochter Milch und dem mit entfetteter Milch, wurde auf die Steapsinwirkung bezogen (Diskussion s. unten).

5. 1 ccm Oel wurde auf 10 ccm Wasser gegeben. In einigen Versuchen habe ich wegen der Angabe einer Anzahl von Autoren, z. B. Rachford, dass Galle resp. Gallensäure die Wirkung des Pankreassteapsins fördern, einen Zusatz von

½ ccm einer 2½ %igen Lösung von gallensaurem Alkali aus Rindsgalle gemacht.

Die Versuchsresultate gebe ich zunächst nach den einzelnen Versuchen geordnet und lasse am Schluss eine Generaltabelle über die durch die einzelnen Versuche ermittelten Werte folgen; an der Hand dieser Tabelle werde ich dann die Versuchsresultate erörtern. Es sei übrigens bemerkt, dass hierher gehörende Vergleichsversuche schon in den letzten, im Abschnitt IV mitgeteilten Versuchen stecken, in denen sowohl Lecithin-Oel-Emulsion als Oel für sich verwendet wurden.

Versuchsreihe I.

Ferment: AI.

I. Seifen-Emulsion.

	Zeit.			
10 ccm Emulsion	sofort	1,35 $\frac{n}{10}$ S.		0,2
10 ccm „	24 Std.	0,45 $\frac{n}{10}$ L.		
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	27,2	„	

II. Lecithin-Oel-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion	sofort	0,45 $\frac{n}{10}$ L.		
10 ccm „	24 Std.	0,45	„	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	28,2	„	1,2

III. Lecithin-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion	sofort	0,25 $\frac{n}{10}$ L.		
10 ccm „	24 Std.	0,3	„	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	27,9	„	1,1

IV. Gekochte Milch.

10 ccm M.	sofort	2,3 $\frac{n}{10}$ L.		
10 ccm „	24 Std.	2,5	„	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	45,1	„	16,05

IVa. Entfettete Milch.

	Zeit.			
10 ccm M.	sofort	0,6 $\frac{n}{10}$ L.		
10 ccm „	24 Std.	0,8	„	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	40,5	„	schwer zu titr. 13,15
25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol		0,15	„	
9 ccm F.	sofort	25,2	„	
9 ccm F.	24 Std.	26,7	„	

Versuchsreihe II.

Ferment: Pankreatin Rhenania. Wasserextrakt (4 : 100). Extraktionszeit: $2^1/_2$ Std.

I. Seifen-Emulsion.

	Zeit.		
10 ccm Emulsion	sofort	2,1	$\frac{n}{10}$ S.
10 ccm „	28 Std.	1,2	$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm „ + 10 ccm F.	28 „	15,5	„

II. Lecithin-Oel-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion	sofort	0,4	$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm „	28 Std.	0,45	„
10 ccm „ + 10 ccm F.	28 „	18,0	„ **0,4**

III. Lecithin-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion	sofort	0,3	$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm „	28 Std.	0,3	„
10 ccm „ + 10 ccm F.	28 „	19,3	„ **1,85**

IV. Gekochte Milch.

10 ccm M.	sofort	2,8	$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm „	28 Std.	5,0	„
10 ccm „ + 10 ccm F.	28 „	53,25	„ **31,1**

IVa. Entfettete Milch.

10 ccm Emulsion	sofort	1,0	$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm „	28 Std.	1,85	„
*) 10 ccm „ + 10 ccm F.	28 „	31,05	„ **12,0**
25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol		0,15	„
10 ccm F.	sofort	14,7	„
10 ccm F.	28 Std.	17,3	„

Versuchsreihe III.

Ferment: Pankreatin Rhenania. Wasser-Extrakt (4 : 120). Extraktionszeit $2^1/_2$ Std.

I. Seifen-Emulsion.

	Zeit.		
10 ccm Emulsion	24 Std.	0,25	$\frac{n}{10}$ L.
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	14,15	„ **0,35**

*) Es wurden zwecks Lösung 20 ccm Alkohol extra beigefügt.

II. Lecithin-Oel-Emulsion — unverdünnt.

		Zeit.		
10 ccm Emulsion		24 Std.	1,2 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	15,25 „	0,45

III. Lecithin-Oel-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion		24 Std.	0,65 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	15,6 „	1,4

IV. Lecithin-Emulsion — unverdünnt.

10 ccm Emulsion		24 Std.	0,5 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	16,5 „	2,45

V. Lecithin-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion		24 Std.	0,3 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	14,2 „	0,35

VI. Gekochte Milch.

10 ccm M.		24 Std.	3,75 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	30,5 „	13,2

VIa. Entfettete Milch.

10 ccm M.		24 Std.	1,9 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	28,5 „	13,05

VII.

1 ccm Oel	+ 10 ccm Wasser	24 Std.	0,45 $\frac{n}{10}$ L.	
1 ccm „	+ 10 ccm „	„	15,35 „	1,35
25 ccm Aether	+ 30 ccm Alkohol		0,15 $\frac{n}{10}$ L.	
9 ccm F.		sofort	10,9 „	
9 ccm F.		24 Std.	13,17 „	

Versuchsreihe IV.

Ferment: Pankreatin Rhenania. Wasserextrakt (1 : 120). 3 Std. extrahiert.

I. Seifen-Emulsion.

		Zeit.		
10 ccm Emulsion		sofort	1,3 $\frac{n}{10}$ S.	
10 ccm „		24 Std.	0,35 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	14,2 „	0,25

II. Lecithin-Oel-Emulsion — unverdünnt.

		Zeit.		
10 ccm Emulsion		24 Std.	0,65 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	15,3 „	1,05

III. Lecithin-Oel-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion		24 Std.	0,25 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	15,8 „	1,95

IV. Lecithin-Emulsion — unverdünnt.

10 ccm Emulsion		24 Std.	0,6 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	15,0 „	0,8

V. Lecithin-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion		24 Std.	0,35 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	15,05 „	1,1

VI. Gekochte Milch.

10 ccm M.		24 Std.	9,8 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	35,3 „	11,9

VIa. Entfettete Milch.

10 ccm M.		24 Std.	2,2 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	30,3 „	14,5

VII.

1 ccm Oel + 10 ccm Wasser		24 Std.	0,25 $\frac{n}{10}$ L.	
1 ccm „ + 10 ccm	„ + 9 ccm F.	„	15,7 „	1,85

VIIa.

1 ccm Oel + 10 ccm Wasser + 0,5 gall. Alk.		24 Std.	0,4 $\frac{n}{10}$ L.	
1 ccm „ + 10 ccm	„ + 0,5 „ „ + 9 ccm F.	„	13,65 „	0,0
25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol			0,15 „	
9 ccm F.		sofort	11,7 „	
9 ccm F.		24 Std.	13,75 „	

Versuchsreihe V.

Ferment: Pankreatin Rhenania. Wasserextrakt (5 : 150). Extraktionszeit 2 Std.

I. Seifen-Emulsion.

		Zeit.		
10 ccm Emulsion		sofort	0,4 $\frac{n}{10}$ S.	
10 ccm „		24 Std.	0,35 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „	+ 9 ccm F.	„	12,75 „	0,0

II. Lecithin-Oel-Emulsion — unverdünnt.

	Zeit.		
10 ccm Emulsion	24 St.	0,75 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	14,7 „	1,3

III. Lecithin-Oel-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion	24 Std.	0,4 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	14,6 „	1,55

IV. Leithin-Emulsion — unverdünnt.

10 ccm Emulsion	24 Std	0,5 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	13 0 „	0,0

V. Lecithin-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion	24 Std.	0,4 $\frac{n}{10}$ L.	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	13,1 „	0,05

VI. Gekochte Milch.

10 ccm M.	sofort	2,95 $\frac{n}{10}$ B.	
10 ccm „	24 Std.	8,3 „	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	31,7 „	10,75

VIa. Entfettete Milch — verunglückt.

VII.

1 ccm Oel + 10 ccm Wasser	sofort	0,4 $\frac{n}{10}$ L.	
„ „	24 Std.	0,4 „	
„ „ + 9 ccm F.	„	15,4 „	2,35

VII a.

1 ccm Oel + 10 ccm Wasser + 0,5 gall. Alk.	sofort	0,35 $\frac{n}{10}$ L.	
„ „ „	24 Std.	0,45 „	
„ „ „ + 9 ccm F.	„	13,5 „	0,4

25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol		0,15 $\frac{n}{10}$ L.	
9 ccm F.	sofort	7,75 „	
9 ccm F.	24 Std.	12,8 „	

Wegen des Verlustes des Versuchs, durch den die Wirkung auf die entfettete Milch festgestellt werden sollte, wurde am nächsten Tage mit derselben Fermentlösung der Milchversuch wiederholt.

Va. Ergänzungsversuch zu V.

Gekochte Milch.

	Zeit.			
10 ccm M.	sofort	3,8 $\frac{n}{10}$ L.	20 ccm Wasser zugesetzt.	
10 ccm „	24 Std.	7,2 „		
10 ccm „	„	42,4 „		**20,95**

Entfettete Milch.

10 ccm M.	sofort	0,9 $\frac{n}{10}$ L.		
10 ccm „	24 Std.	1,5 „		
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	27,2 „		**11,45**
25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol		0,15 $\frac{n}{10}$ L.		
9 ccm Ferment	sofort	11,7 „	20 ccm Wasser zugesetzt.	
9 ccm F.	24 Std.	14,4 „		

Versuchsreihe VI.

Ferment AIV: Chloroformwasser-Extrakt (12 : 120). 24 Std. ausgezogen.

I. Seifen-Emulsion.

	Zeit.		Wasserzusatz.	
10 ccm Emulsion	sofort	−0,65 Säure		
10 ccm „	24 Std.	0,55 $\frac{n}{10}$ L.	0,55	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	26,1 „	26,1	**2,0**

II. Lecithin-Oel-Emulsion — verdünnt.

10 ccm Emulsion	24 Std.	0,35 $\frac{n}{10}$ L.	0,5	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	31,1 „	29,7	**5,7**

III. Gekochte Milch.

10 ccm M.	sofort	3,4 $\frac{n}{10}$ L.	3,4	
10 ccm „	24 Std.	9,4 „	9,4	
10 ccm „ + 9 ccm F.	„	36,7 „	37,4	**1,5**

Milch nach der Titration gallertig; Lösung des Caseins durch die NaOH.

IV. Entfettete Milch.

10 ccm M. (25)	sofort	5,6 $\frac{n}{10}$ S.		
10 ccm „ (25)	24 Std.	2,1 $\frac{n}{10}$ L.	2,1	
10 ccm „ (25) + 9 ccm F.	„	29,0 „	29,0	**3,4**

V.	Zeit.		Wasserzusatz.	
1 ccm Oel + 10 ccm Wasser	24 Std.	0,4 $\frac{n}{10}$ L.	0,5	
1 ccm „ + 10 ccm „ + 9 ccm F.	„	25,3 „	24,8	0,8

VI.				
1 ccm Oel + 10 ccm Wasser + 0,5 gallens. Alk.	24 Std.	0,3 $\frac{n}{10}$ L.	3 Tr.	
1 ccm „ + 10 ccm „ + 0,5 „ + 9 ccm F.	„	27,6 „	26,2	2,0
25 ccm Aether + 30 ccm Alkohol		0,15 $\frac{n}{10}$ L.		
9 ccm F.	24 Std.	24,0	23,7	

Tabelle
über Wirkung auf verschiedene Emulsionen.

	I.	II.	III.	IV.	V.	Va.	VI.
Oel mit Wasser			1,35	1,85	2,35		
Oel mit Wasser + gallens. Alkali				0,0	0,4		2,0
Seifen-Emulsion	0,2	0	0,35	0,25	0,0		2,0
Lecithin-Oel-Emuls. unverd.			0,45	1,05	1,3		
Lecithin-Oel-Emuls. verdünnt	1,2	0,4	1,4	1,95	1,55		5,7
Lecithin-Emuls. unverdünnt			2,45	0,8	0,0		
Lecithin-Emuls. verdünnt	1,1	1,85	0,35	1,1	0,05		
Gekochte Milch	2,9	19,1	0,15	negativ	verunglückt	9,5	negativ
Entfettete „							

Im allgemeinen wirkt also eine steapsinhaltige Fermentlösung sowohl auf Oel allein, als auch auf Oel, welches durch Lecithin emulgiert ist, ferner auf emulgiertes Lecithin selbst gut ein; häufiger ist die Wirkung auf Oel allein nicht so stark wie auf emulgiertes Oel (cf. auch aus Abschnitt IV Pankreasbearbeitung C, ferner Pankreatin III); zuweilen ist aber auch das Umgekehrte der Fall. (Abschnitt IV Pan-

kreatin II und die dabei behandelten C.-Präparate.) Bestimmte Regeln wage ich darüber nicht aufzustellen; auch einfach emulgiertes Lecithin wird gespalten.

Zusatz von gallensaurem Alkali zu den Oelspaltungen wirkt eher hemmend als fördernd; es müssen sich darin also die Pankreas-Extrakte anders verhalten als der reine Pankreassaft.

Mit kohlensaurem Natron emulgiertes gewöhnliches säurehaltiges Oel erwies sich als ein nicht günstiges Objekt; die Wirkung des Fermentes ist entschieden geringer als auf Oel allein. Ausserdem tritt im Laufe der Wirkungszeit eine Säuerung der Emulsion an sich ein, die jedenfalls störenden Einfluss hat.

Die Milchversuche hatte ich angestellt, um eine Anschauung von der Wirkung des Fermentes auf natürliche Emulsionen zu bekommen. Die Feststellung der Wirkungsgrösse stösst hierbei auf Schwierigkeiten, die sich, wie die Versuche zeigen, mit Sicherheit nicht überwinden lassen. Von der Säuerung, welche die gesamte Milch durch das Extrakt erfährt, muss der Betrag in Abzug gebracht werden, der durch die Wirkung des Trypsins, das sich ja ebenfalls in den Extrakten befindet, auf die in der verwendeten Milch enthaltenen Eiweisskörper hervorgerufen wird. In der Bestimmung dieses Betrages aber liegt die wesentliche Schwierigkeit. Die Entfettung der Milch lässt sich vollkommen erst erzielen, wenn man ihre Eiweisskörper durch Pepsinsalzsäure verdaut (Plüger, Dormeyer). Das Verfahren war für unseren Fall nicht anwendbar. Die unmittelbare Extraktion mit Aether nach Alkalizusatz beseitigt nicht alles Fett, darum wird in den Kontrollproben ausser der Trypsinwirkung auch noch Steapsinwirkung zutage treten; die in Abzug zu bringende Zahl wird somit zu gross. Dazu kommt, dass durch den Alkalizusatz die Trypsinwirkung begünstigt wird, wodurch ebenfalls zu hohe Zahlen für die Kontrollprobe erhalten werden. Von diesen Gesichtspunkten sind auch jedenfalls diejenigen Versuche aufzufassen, in denen als Resultate ein negativer Wert sich ergeben würde.

Die Herrichtung der entfetteten Milch ist ausserdem immer zeitraubend; alles in allem, eignet sich also auch die Milch als Substrat für quantitative Versuche nicht, wenn auch in günstigen Fällen ihre fein emulgierten Fette am besten angegriffen werden.

Genau dieselben Einwände sind in unserem Falle gegen

die Verwendung einer Eigelbemulsion vorzubringen, wie sie Volhard und seine Mitarbeiter benutzten. Das Eigelb enthält an sich Eiweiss und kann aus dem Ei ohne anhaftendes Eierklar nicht getrennt werden. Das war der Grund, warum in meinen Versuchen von vorneherein für die Emulsion reines, d. h. eiweissfreies Lecithin in Anwendung kam.

Nach diesen Ergebnissen ist es gut, entweder in Wasser geschütteltes oder noch besser mit Lecithin emulgiertes Olivenöl für Versuche über fermentative Fettspaltung zu verwenden; ob sich noch bessere Präparationen bei Heranziehung anderer Fette erzielen lassen, wäre weiter festzustellen. —

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. In Verdauungsgemischen, bei denen Fette durch Fermente gespalten sind, kann man zur annähernden Bestimmung eines der Säuremenge proportionalen Wertes nach Zusatz von Aether und Alkohol einfach acidimetrisch verfahren, wenn man sich durch nachträglichen Wasserzusatz davon überzeugt, dass man den richtigen Neutralisationspunkt innegehalten hat.

2. Aus dem Pankreas von Rindern lassen sich steapsinhaltige Glycerin-Extrakte und Trockenpulver herstellen, welche besser wirksam sind, wenn das Pankreas 24 Std. gelegen hat.

3. Aus Pankreas-Trockenpulvern erhält man mit Wasser wirksamere Extrakte als mit Glycerin. Das Zeitoptimum der Wasser-Extraktion schwankt bei einzelnen Pulvern; für das käufliche „Pankreatin Rhenania" liegt es bei 2—4 Std.

4. Aus Pankreasextrakten lassen sich unter Verwendung von Kieselguhr mit Hülfe der Saugpumpe klare Filtrate gewinnen. Diese haben gute tryptische und diastastische Wirkung, dagegen enthalten sie kein Steapsin mehr.

5. Als zu verdauende Flüssigkeit eignet sich gut Oel für sich oder Oel, das durch Lecithin in Wasser emulgiert ist.

6. Glycerin hemmt die Fermentwirkung.

Vorliegende Arbeit habe ich auf Veranlassung des Herrn Prof. Dr. Frank unter Leitung des Herrn Privatdozenten Dr. Seemann im physiologischen Institute der Universität Giessen angefertigt. Beiden Herren sage ich an dieser Stelle meinen ehrerbietigsten Dank.

Literatur-Verzeichnis.

1. Bernard, cit. nach Gamgee: „Phys. Ch. der Verdauung", Leipzig und Wien 1897. 224; 225; 226.
2. Berthelot, cit. nach Gamgee 225.
3. Bidder und Schmidt, „Die Verdauungssäfte" (1852) 250.
4. Biedermann, Pflüg. A. 72. 157 (1898).
5. Bonchardat und Sandras, cit. nach Gamgee 222.
6. Connstein, Pflüg. A. 65. 473. 69. 76.
   Ders., Ergebn. für Physiologie III. 206.
7. Danilewski, cit. nach Gamgee 222.
8. Engel, „Ueber das Zeit- und Fermentgesetz des Pankreassteapsins." Diss. Giessen 1905.
9. Grützner, Pflüg. A. 12. 302 ff. (1876).
10. Hanriot, C. R. 123.
11. Harris und Gow, cit. nach Gamgee 218.
12. Heidenhain, Pflüg A. 10. 557 ff.
13. Heritsch, Zentralblatt für die med. Wissenschaften. 1875. No. 28. „Ueber die zersetzende Wirkung des pankreatischen Glycerinauszuges auf Essigsäureäther."
14. Kühne, Lehrbuch der Phys. Chemie. Leipzig 1868. 122 ff.
   Ders., cit. nach Salkowski, „Praktikum der Physiologischen und Pathologischen Chemie", Berlin 1906. 147, 148.
15. Neumeister, „Lehrbuch der phys. Chemie", Jena 1897. 188. 292.
16. Oppenheimer, „Die Fermente und ihre Wirkungen", Leipzig 1901. 43 227 ff.
17. Roberts, cit. nach Gamgee 218. 227.
18. B. K. Rachford, The Influence of Bile on the fat-splitting Properties of pancreatic Juice. Journal of Physiology XII. 79.
19. Stade, „Untersuchungen über das fettspaltende Ferment des Magens", Diss. Braunschweig 1902.
20. Volhard, „Ueber das fettspaltende Ferment des Magens", Zeitschrift für klin. Medizin 42. 414 ff.
   Ders., „Ueber das fettspaltende Ferment des Magens", Zeitschrift für klin. Medizin 43 397 ff.
21. v. Wittich, cit. nach Gamgee 222.
22. Zinsser, „Ueber den Umfang der Fettverdauung im Magen", Diss. Braunschweig 1905.

Lebenslauf.

Geboren bin ich, Karl Wilhelm Stolz, am 12. Oktober 1880 zu Ehrenbreitstein am Rhein. Auf dem städtischen Realgymnasium zu Koblenz erlangte ich Ostern 1897 die Reife für Unter-Prima und studierte vom Sommersemester 1897 bis zum Wintersemester 1898/99 Tierheilkunde an der tierärztlichen Hochschule zu Hannover. Im Wintersemester 1898/99 legte ich in Hannover die naturwissenschaftliche Prüfung ab. Nun unterbrach ich mein Studium für 2 Jahre. Während dieser Zeit bereitete ich mich auf das Maturitäts-Examen vor und unterzog mich im März 1901 am Realgymnasium zu Koblenz der Maturitäts-Prüfung mit Erfolg. Mit Beginn des Sommersemesters 1901 setzte ich meine tierärztlichen Studien fort an den Hochschulen zu Berlin und Hannover. Die tierärztliche Fachprüfung bestand ich in Hannover im Wintersemester 1902/03. Nach erlangter Approbation war ich als Assistent bezw. Vertreter in Montabaur, Kierspe i. W. und Lüdenscheid i. W. tätig. Von Oktober 1904 bis dahin 1905 genügte ich meiner Militärpflicht beim Rheinischen Train-Bataillon No. 8 zu Ehrenbreitstein. Nach meiner Militärzeit wurde ich Assistent am Schlachthofe zu Mühlheim, Ruhr. Von Mai bis September 1906 arbeitete ich im physiologischen Institut der Universität Giessen. Seit November 1907 bin ich als zweiter Tierarzt bei der Königl. Preussischen Auslandsfleischbeschaustelle zu Borken i. W. angestellt.